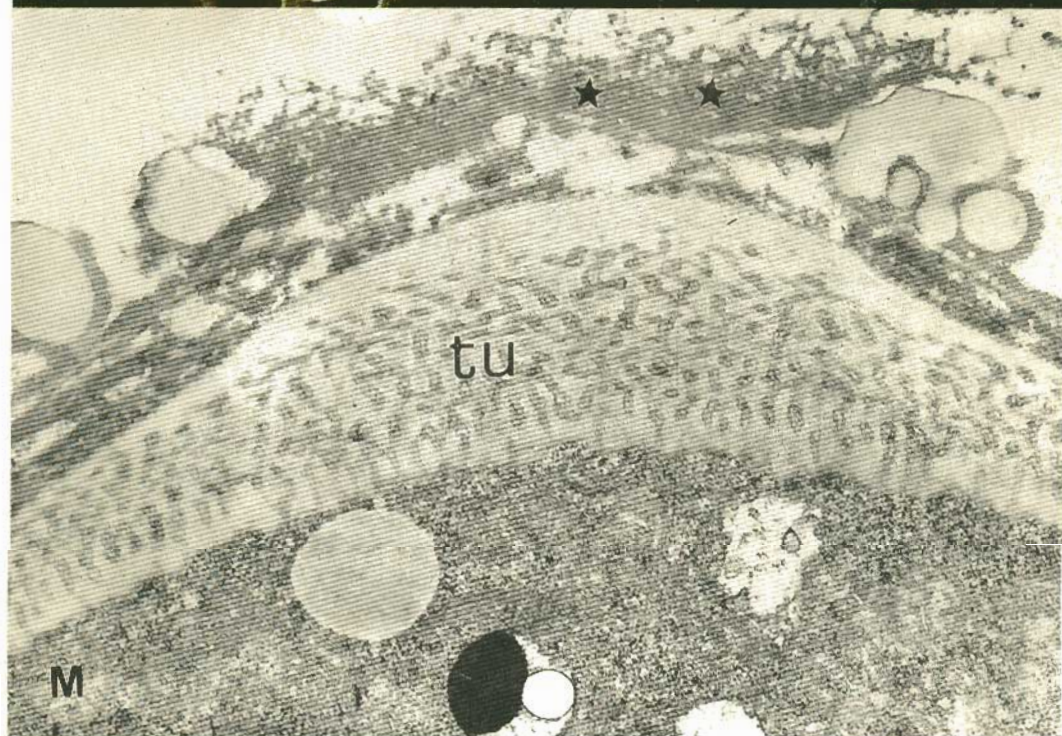


POLEN, ESPORAS Y SUS APLICACIONES

EDITORES:

G. BLANCA
C. DIAZ DE LA GUARDIA
M.C. FERNANDEZ
M. GARRIDO
M.I. RODRIGUEZ - GARCIA
A.T. ROMERO GARCIA.



VII SIMPOSIO DE PALINOLOGIA

Estudio de la formación de la pared especial de calosa durante la microsporogénesis de *Olea europaea* L. mediante técnicas de microfluorescencia

J.D. ALCHE, M.C. FERNANDEZ & M.I. RODRIGUEZ-GARCIA

Estación Experimental del Zaidín. Profesor Albareda 1. 18008 Granada, España

Resumen

Se ha realizado un estudio sobre la formación de la pared especial de calosa durante la microsporogénesis en *Olea europaea* L. simultaneando el empleo de una tinción de tipo general para microscopio óptico, con una técnica específica para detectar este material (azul de anilina) y microscopía electrónica de transmisión.

La utilización del azul de anilina con epifluorescencia, sin embargo no pone de manifiesto la presencia de otro tipo de material que inicia su acumulación con anterioridad a la formación de los primeros indicios de calosa y que continúa acumulándose durante toda la meiosis. Se trata probablemente de material "precalósico", es decir, precursores glucídicos de la calosa con bajo o nulo grado de polimerización y que son perfectamente diferenciables de ésta además de por no presentar fluorescencia secundaria con azul de anilina, básicamente por presentar un aspecto mucho más translúcido a los electrones frente al color grisáceo de la calosa, en observaciones con microscopía electrónica de transmisión.

Palabras clave: Microsporogénesis, calosa, fluorescencia, *Olea europaea*.

Abstract

Formation of the special wall of callose during microsporogenesis was studied simultaneously using a general stain for light microscope, a specific technique for this material (aniline blue) and transmission electronic microscope. The use of aniline blue with epifluorescence, however, does not show the presence of another type of material which starts to accumulate before the formation of the first indications of callose, and which continues to accumulate throughout meiosis. This may be "precallosic" material, i. e. relatively unpolymerized glucide precursors of callose, which are clearly distinguishable from the callose itself. This material does not reveal secondary fluorescence with aniline blue, and under transmission electron microscopy is much more electron translucent in comparison to the greyish color of the callose.

Key words: microsporogenesis, callose, fluorescence, *Olea europaea*.

Introducción

Acompañando el desarrollo del proceso meiótico durante la microsporogénesis de las Angiospermas, se deposita alrededor de las células madres de microsporas una pared especial formada por un material de carácter birrefringente, cuando se observa con microscopía óptica, denominado calosa.

La calosa ha sido caracterizada como un $\beta(1-3)$ -glucano (KESSLER, 1958) que puede encontrarse así como en la megasporogénesis en otros órganos de la planta, como por ejemplo en el tubo polínico, asociada a los tejidos conductores de diferentes regiones de la planta, y como una respuesta prácticamente universal de las plantas superiores a cualquier tipo de daño.

El modelo de deposición de este material durante la microsporogénesis es bastante similar en todas las especies donde ha sido estudiado (WATERKEYN, 1962; SKVARLA & LARSON, 1966), salvo algunas excepciones ilustradas en la literatura (DUNBAR, 1973; VIJAYARACHAVAN & SHUKLA, 1977).

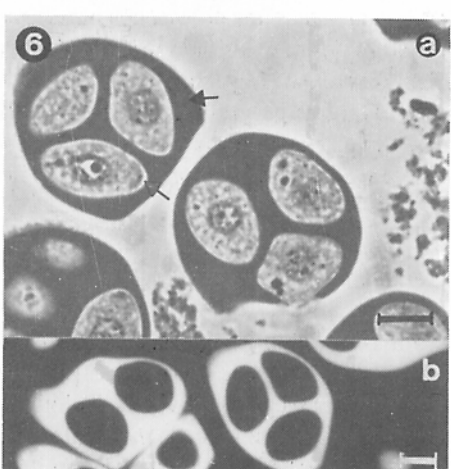
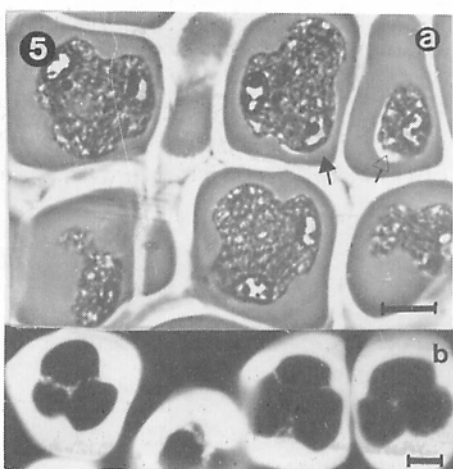
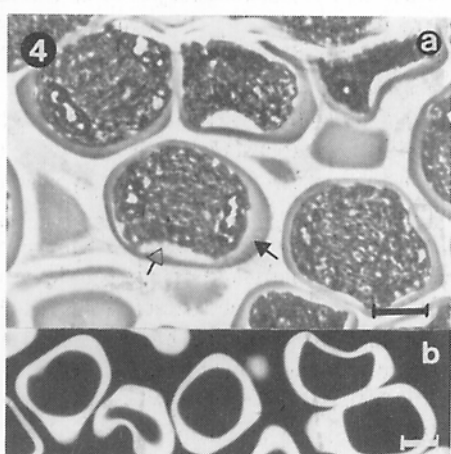
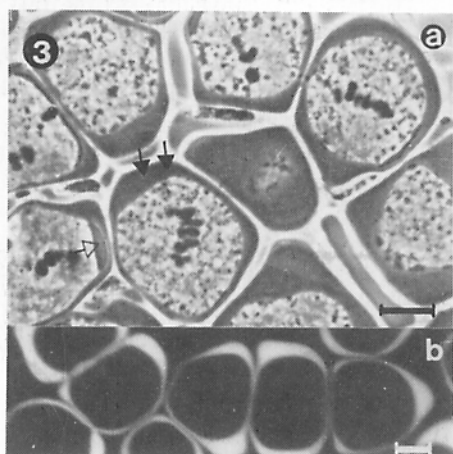
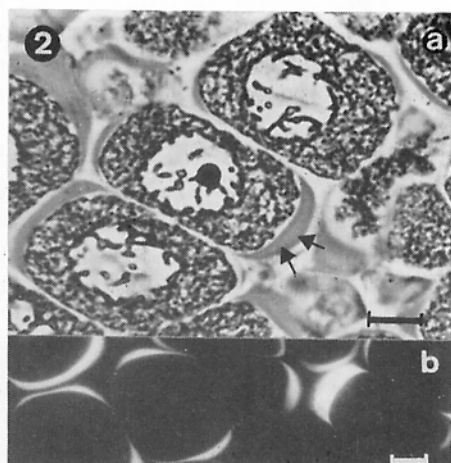
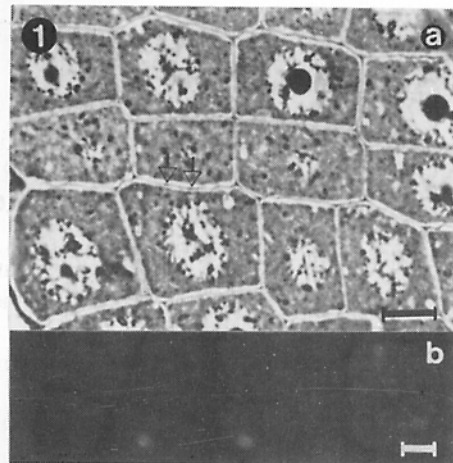
Son muchas las interpretaciones dadas acerca de su posible papel fisiológico. Algunos autores indican que la calosa es un subproducto derivado de una descompensación metabólica, mientras que otros piensan que tiene una función reparadora frente al daño tisular u oclusiva en zonas conductoras o de plasmodesmos. En el caso concreto de la microsporogénesis no es clara la función de esta pared, aunque se le atribuye un papel de aislamiento y protección de los meiocitos, quizás frente a un inadecuado balance hídrico, gracias a su naturaleza altamente higroscópica (BARSKAYA & BALINA, 1971). HESLOP-HARRISON & MACKENZIE (1967) indican que la calosa actúa a modo de un "filtro molecular" o interfase entre células que son genéticamente diferentes, siendo considerada como un requisito para el desarrollo de los meiocitos hasta microsporas (HESLOP-HARRISON, 1964).

Existen diversas técnicas histoquímicas para la detección de la calosa, como la utilización del Lacmoid o de la solución de plata Tollens (SKOU, 1984), pero nuestro método de elección es el empleo de microscopía de fluorescencia usando Azul de Anilina como fluorocromo, cuyo uso fué introducido ya por ARENS (1949) y que actualmente es el más generalizado, presentando un alto grado de especificidad. Empleando este fluorocromo, WATERKEYN (1962) estudió los cambios en la acumulación de calosa durante la microsporogénesis en *Helleborus foetidus*, estableciendo todas sus etapas. Nuestro estudio en *Olea europaea* confirma y completa las líneas generales establecidas en dicho trabajo, combinando las técnicas de fluorescencia indicadas con una técnica básica de tinción para microscopía óptica y mediante observaciones al microscopio electrónico de transmisión, desde el inicio de la meiosis hasta el final del estadio de tetradas.

Material y métodos

El material utilizado ha sido anteras jóvenes de olivo (*Olea europaea* L.) en diversos grados de desarrollo. Las anteras fueron fijadas en glutaraldehído 3% en tampón cacodilato 0,025 M, deshidratadas en pasos alcohólicos de gradación creciente, incluidas en resina L.R. White, y polimerizadas a 65 °C durante 12 horas. Para observar la fluorescencia secundaria de la calosa se

Figs. 1 a 6. Secciones de microsporocitos de *Olea europaea* en diversos estadios meióticos teñidos con Azul de Metileno-Azul II y observados con microscopía óptica (a) y (b) con epifluorescencia tras teñir con azul de anilina. Fig. 1: leptotene-zigotene. Fig. 2: paquitene tardía. Fig. 3: metafase I. Fig. 4: telofase I. Fig. 5: telofase II. Fig. 6: tetradas. Nótese la presencia de materiales precalósicos (→) diferenciables de la calosa (→). En la Fig. 3a, la pared no teñida parece estarlo a causa de su birrefringencia en contraste de fase. La escala gráfica representa 10 μ m.



realizaron cortes semifinos que fueron tratados con solución 0,01% de azul de anilina en PO_4HK_2 , 1,5% peso/volumen durante 30 minutos. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Zeiss equipado con lámpara de fluorescencia HBO 50 bajo la combinación de filtros BP 436/8, FT 460, LP 470.

Paralelamente otra serie de cortes semifinos de cada antera fueron tratados con azul de metileno-azul II (HUMPHREY, 1974) con objeto de hacer un seguimiento determinativo del estadio meiótico de cada una de ellas.

Los cortes ultrafinos fueron obtenidos en un ultramicrotomo REICHERT "Ultracut", contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, y observados en un MET Zeiss EM10 C.

Resultados

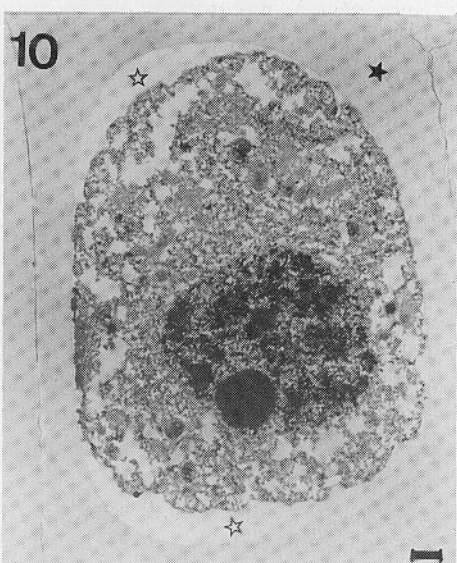
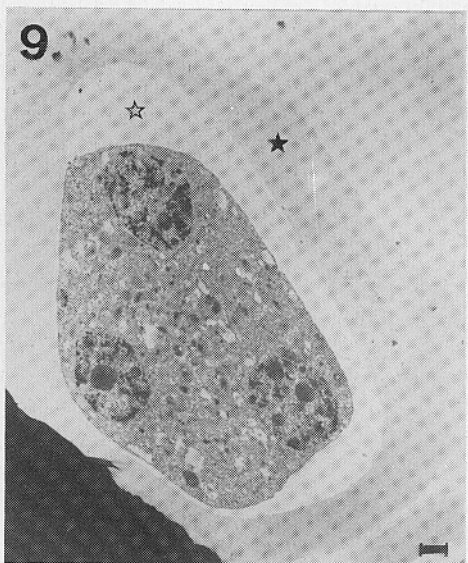
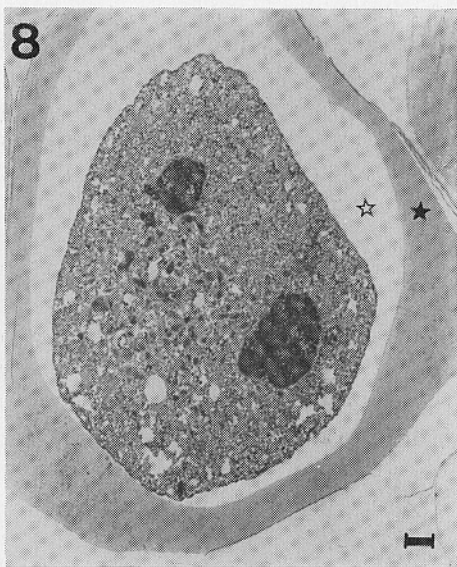
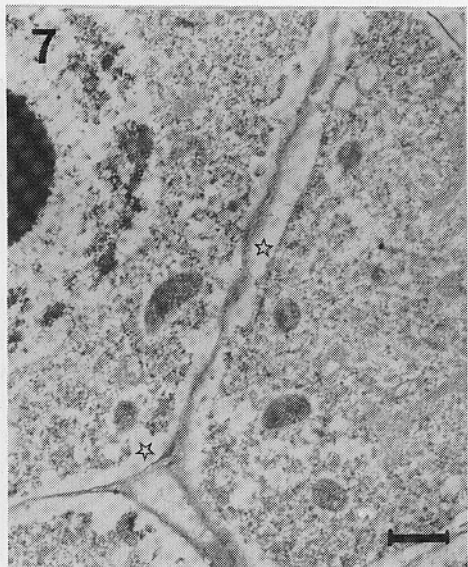
El inicio de deposición de material birrefringente sobre los microsporocitos de *Olea europaea* se realiza entre el plasmalema y la pared celular original durante la Profase I, en principio de forma bastante discontinua (Fig. 1a) y sin que estas primeras acumulaciones aparezcan teñidas por la solución de azul de metileno-azul II. De igual modo tampoco presentan fluorescencia secundaria al ser observadas bajo epifluorescencia (Fig. 1b), y como muestra la Figura 7, al observarlas con microscopía electrónica de transmisión se trata de un material translúcido a los electrones.

La primera respuesta positiva al tratamiento con azul de anilina (Fig. 2b) puede apreciarse en un periodo caracterizado por una mayor continuidad en la capa de material segregado por los meiocitos y que sí comienza ya a teñirse con el procedimiento usual de azul de metileno-azul II (Fig. 2a), pero sin llegar aún a rodear uniformemente a los microsporocitos, sino que se encuentra especialmente acumulado en las esquinas o vértices de las células madres de polen. Por la morfología nuclear, puede caracterizarse este periodo como paquitene tardía, y puede observarse una exacta correspondencia entre la cubierta que se tiñe con azul de metileno-azul II y la que presenta una fuerte fluorescencia amarillo-verdosa con azul de anilina (Fig. 2a y 2b).

El tamaño de la capa segregada se va haciendo progresivamente mayor, recubriendo la totalidad de la superficie de los meiocitos, de forma que ya en metafase I esta continuidad sólo se ve interrumpida por la presencia de numerosas conexiones intercelulares (Fig. 3a). Durante metafase I se observa además una nueva capa birrefringente, adyacente e interior a la ya formada, de la cual se diferencia por su negatividad a la tinción convencional y por no mostrar fluorescencia secundaria con azul de anilina (Figs. 3a y 3b).

A medida que progresa la división meiótica, las conexiones intercelulares tan frecuentes en metafase I van poco a poco eliminándose debido al incremento en el espesor de la pared calósica que recubre a la célula, de forma que ya al final de la primera división meiótica son muy escasas (Figs. 4a y 4b).

Figs. 7 a 10. Fotomicrografías electrónicas de microsporocitos de *Olea europaea*. Fig. 7: Leptotene-zigotone. Fig. 8: Final de la primera división meiótica. Fig. 9: Final de la segunda división meiótica. Fig. 10: microspora de una tetrada. Obsérvese la acumulación de materiales transparentes a los electrones (*) claramente diferenciales de la capa de calosa (*). La escala gráfica representa 1µm.



El incremento en grosor de esta pared especial no se realiza proporcionalmente, sino que se hace mayor la capa teñida por azul de metileno-azul II y que presenta fluorescencia secundaria, mientras disminuye el grosor de la capa no teñida. Esta clara diferencia entre ambas también se hace evidente al microscopio electrónico, debido a su diferente permeabilidad a los electrones: la nueva capa formada (Fig. 8) es mucho más transparente y con características similares a las primeras acumulaciones formadas alrededor de los meiocitos (Fig. 7), mientras la zona más externa y que da positivo en la fluorescencia con azul de anilina típica de la calosa, presenta una densidad media gris a los electrones y carece de una estructura interna definida.

El material transparente a los electrones continúa depositándose hasta el final de la meiosis (Figs. 5a y 9). El inicio de la tabicación de las microsporas se detecta por una intensa fluorescencia de la placa celular (Fig. 5b) en el centro de la tetrada, que va definiéndose paulatinamente, incluso con intensidad superior a la de la calosa. La última capa localizable de material calósico se va a ir formando en situación adyacente a la placa celular, y es el último indicio de deposición calósica que puede visualizarse cronológicamente en toda la microsporogénesis (Figs. 6a, 6b y 10), ya que a partir de este estadio de tetrada ya perfectamente tabicada, y una vez que la exina está suficientemente desarrollada, se inicia la degradación y disolución de la cubierta calósica que culmina con la liberación de las microsporas.

Discusión

La utilización de tinciones más o menos específicas de la calosa (azul de anilina, Lacmoid, solución de plata Tollens) para estudiar la formación de la pared especial de calosa durante la microsporogénesis, ha contribuido al hecho de que usualmente se fije la aparición de los primeros depósitos de este material sobre la mitad de la profase I, entre los estadios de paquitene-diplovene, siguiendo patrones como el observado en las Figs. 2a y 2b (acumulación en los vértices o esquinas de la célula).

Sin embargo en *Olea europaea* ya en estadios tempranos de la profase I como son leptotene o cigotene, se observan sobre cortes a microscopía electrónica ciertos depósitos de material transparente a los electrones localizados extracelularmente y en contacto con el plasmalema, que como ya hemos indicado, aparecen a lo largo de prácticamente todo el desarrollo de la meiosis, experimentando ligeras modificaciones en cuanto a su grosor.

El hecho de la continuada presencia de esta capa, unido a la existencia de otras descripciones de material transparente a los electrones en situación similar en *Helleborus foetidus* (ECHLIN & GODWIN, 1968), hace descartar la posibilidad frecuentemente apuntada de que nos encontremos frente a un fenómeno de retracción o artefacto ocurrido durante la fijación y el tratamiento de las muestras. Por otra parte, las modificaciones del grosor de esta capa transparente en momentos determinados de la meiosis frente a las experimentadas por la capa de calosa, parecen indicar algún tipo de relación entre ambas.

Como posible explicación de este hecho, apuntamos que la capa transparente a los electrones esté formada por materiales de tipo glucídico con carácter "precalósico", es decir, precursores de la calosa con nulo o muy bajo nivel de polimerización, lo cual sería la causa de su ausencia de respuestas a tinciones más o menos específicas para polímeros de glucosa $\beta(1-3)$, y de su menor densidad a los electrones en relación a la capa de calosa perfectamente polimerizada. Según esto, los precursores glucídicos serían acumulados como tales entre el plasmalema y la pared primaria del meiocito en las primeras etapas, y posteriormente entre el plasmalema y la capa de calosa

propriadamente dicha una vez que comienza a producirse la transformación de los materiales "precalósicos" en la calosa definitiva. Esta transformación sería llevada a cabo por una actividad enzimática polimerasa extracelular.

De la relación entre la tasa de actividad polimerasa y la tasa de acumulación extracelular de precursores dependería el incremento o disminución en grosor de la capa transparente a los electrones y de la capa más densa de calosa, observables por microscopía electrónica en los diferentes estadios meióticos.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a D^a Matilde Garrido Ortiz su colaboración técnica, y a M. Granero Gilabert su aportación mecanográfica.

Este estudio ha sido financiado por la Comisión Asesora para la Investigación Científica y Técnica y C.S.I.C. (Proyecto N^o 1-179-2ID 181/906).

Bibliografía

- Arens, K. (1949). Prova de calose por meio da microscopía a luz fluorescente e applicações do metado. *Lilloa* 18: 71.
- Barskaya, E. I. & N. V. Balina (1971). The role of callose in plant anthers. *Fiziol. Rast.* (English Transl.) 18: 605-610.
- Dunbar, A. (1973). Pollen development in the *Eleocharis palustris* group (*Cyperaceae*). I. Ultrastructure and Ontogeny. *Bot. Not.* 126: 197-254.
- Echlin, P. & H. Godwin (1968). The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. I. The development of the tapetum and Ubisch bodies. *J. Cell. Sci.* 3: 161-174.
- Heslop-Harrison, J. (1964). Cell walls, cell membranes, and protoplasmic connections during meiosis and pollen development. In: H. F. Linskens (ed.), *Pollen physiology and fertilization*: 39-47. Amsterdam.
- Heslop-Harrison, J. & A. Mackenzie (1967). Autoradiography of (2-¹⁴C)-thymidine derivative during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. *J. Cell. Sci.* 2: 387-400.
- Humphrey, Ch. D. & F. E. Pittman (1974). A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol.* 49, 1: 9-14.
- Kessler, G. (1958). Zur Charakterisierung der Siebröhrenkallose. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 68: 5-43.
- Skou, J. P., J. Helms Jorgensen & U. Lilholt (1984). Comparative Studies on Callose Formation in Powdery Mildew Compatible and Incompatible Barley. *Phytopath. Z.* 109: 147-168.
- Skvarla, J. J. & J. A. Larson (1966). Fine structural studies of *Zeamays* pollen. I. Cell membranes and exine ontogeny. *Am. J. Bot.* 53: 1112-1125.
- Vijayaraghavan, M. R. & A. K. Shukla (1977). Absence of callose around the microspore tetrad and poorly developed exine in *Pergularia laemia*. *Ann. Bot.* 41: 923-926.
- Waterkeyn, L. (1962). Les parois microcytaires de nature callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*. *Celule* 62: 225-255.