

## CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO NORMAL DEL SACO EMBRIONARIO EN OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.)\*

por

GUADALUPE EXTREMERA, HAVA F. RAPOPORT & LUIS RALLO\*\*

### Resumen

EXTREMERA, G., H. F. RAPOPORT & L. RALLO (1988). Caracterización del desarrollo normal del saco embrionario en olivo (*Olea europaea* L.). *Anales Jard. Bot. Madrid* 45(1): 197-211.

Se han caracterizado secuencialmente los estados de desarrollo del saco embrionario de olivo con mayor precisión que en estudios previos. Se han definido los siguientes estados: 1) célula arqueosporial, 2) célula madre de la megáspora, 3) díada, 4) bispóra, 5) bispóra polarizada, 6) saco tetranucleado, 7) saco octonucleado inmaduro, 8) saco embrionario octonucleado maduro. Se propone la polarización de la bispóra como el comienzo de la megagametogénesis. Se ha evidenciado la presencia de la hipóstasis, cuerpo basal nucelar no descrito en anteriores estudios embriológicos sobre olivo. El desarrollo es del tipo *Allium*, aunque eventualmente se han observado sacos con desarrollo del tipo *Endymion*. La cronología del desarrollo ha puesto de manifiesto que la transición entre estados es mucho más breve cuando los cambios solo suponen división que cuando comportan además elongación y ensanchamiento del saco y migración de núcleos.

Palabras clave: *Oleaceae*, *Olea*, hipóstasis, megasporogénesis, megagametogénesis, saco embrionario.

### Abstract

EXTREMERA, G., H. F. RAPOPORT & L. RALLO (1988). Characterization of the normal embryo sac development in the olive (*Olea europaea* L.). *Anales Jard. Bot. Madrid*. 45(1): 197-211 (in Spanish).

The embryo sac development in the olive (*Olea europaea* L.) is examined in greater detail than in previous studies, including the characterization of the following sequential stages: 1) archesporial cell; 2) megasporocyte; 3) dyad; 4) bispore; 5) polarized bispore; 6) four-nucleate embryo sac; 7) immature eight-nucleate embryo sac; 8) mature eight-nucleate embryo sac. The polarization of the bispore is proposed as the onset of megagametogenesis. The hypostase, a basal nucellar tissue previously not observed in olive, is described. The bispore developmental pattern of the olive embryo sac was found to generally conform to the *Allium* type although occasional cases of *Endymion* type development were also observed. The timecourse of development indicates that the transition between development stages is much more rapid when only cell division is involved as compared to when embryo sac expansion and nuclear migration also occur.

Key words: *Oleaceae*, *Olea*, hypostase, megasporogenesis, megagametogenesis, embryo sac.

\* Este trabajo se ha realizado con cargo al proyecto 2009/83 sobre "Fructificación del olivo" financiado por la CAICYT.

\*\* Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba. 14080 Córdoba.

## INTRODUCCIÓN

El estudio del desarrollo del saco embrionario del olivo ha recibido poca atención hasta la fecha. El primer trabajo publicado (KING, 1938) esboza muy someramente este desarrollo. Solo varios años después, MESSERI (1950) realizó un estudio más detallado, en el que describió la esporogénesis y la gametogénesis del olivo. ALTAMURA BETTI & *al.* (1982) realizaron un estudio similar al anterior, y otros autores, como MAZZOLANI (1973), BINI & LENSÍ (1981), añadieron posteriormente ciertos detalles. En conjunto, estos estudios establecen que el primordio seminal en olivo es anátropo, unitegumentado y tenuinucelado con un saco embrionario de desarrollo bispórico tipo *Allium*. Por otro lado, las únicas referencias a desarrollos anómalos del saco embrionario en olivo han relacionado los mismos con alteraciones en la fructificación de distintos cultivares de olivo (BRADLEY & GRIGGS, 1963; RALLO & *al.*, 1981).

En el presente trabajo se ha pretendido caracterizar los estados de desarrollo del saco embrionario en el cultivar de olivo 'Manzanilla', que es de apariencia normal en la antesis; también se ha tratado de definir el calendario de los estados de desarrollo establecidos en relación con la misma.

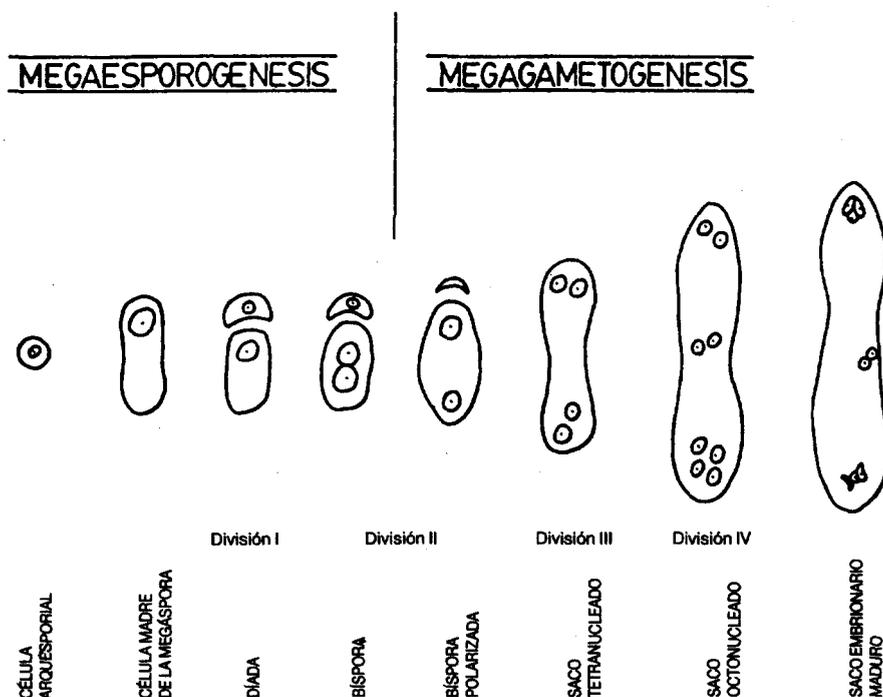


Fig. 1.—Esquema del desarrollo del saco embrionario en olivo (dibujo de G. Extremera).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Durante las primaveras de 1982 y 1983 se tomaron inflorescencias completas de la zona media de ramos floríferos bien constituidos del cultivar de olivo 'Manzanilla'. Los árboles se encontraban en la finca "Alameda del Obispo" perteneciente al INIA en Córdoba, donde se cultivaban en régimen de riego. Los ramos fueron elegidos por su buena floración y orientación según los distintos puntos cardinales, que se procuró estuviesen igualmente representados. El muestreo fue diario y se refirió a la plena floración (fecha en que más del 75 % de las inflorescencias tienen más de la mitad de las flores abiertas). De esta manera, las muestras correspondieron al período comprendido entre 20 días antes de plena floración (PF-20) y plena floración (PF).

Las flores se individualizaron y procesaron según los métodos clásicos de inclusión en parafina descritos por JOHANSEN (1940) y JENSEN (1962). El material se fijó en FAE durante un mínimo de 48 horas y se guardó en etanol del 70 % hasta el momento de la deshidratación en series de alcohol butílico terciario (JENSEN, 1962) e inclusión en Paraplast + o Histoplast. Las muestras así preparadas fueron seccionadas con un grosor de 10 a 12  $\mu\text{m}$  con un microtomo de rotación. La tinción ha sido realizada con ácido tánico-cloruro férrico-safranina-Fast-Green, que es una modificación de la técnica descrita por JENSEN (1962).

Como cada flor de olivo contiene 4 primordios seminales, se observaron de 5 a 10 flores por fecha de muestreo hasta conseguir un mínimo de 20 a 25 primordios seminales interpretables por fecha. Las preparaciones se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico.

## RESULTADOS

### I. Caracterización de los estados de desarrollo del saco embrionario

Para la definición de los estados de desarrollo se han considerado los siguientes criterios: el número de células y núcleos que intervienen en el desarrollo, su aspecto, tamaño y forma; las divisiones nucleares acontecidas; las migraciones nucleares, y las transformaciones morfológicas que acompañan a las divisiones nucleares. También se ha tenido en cuenta el aspecto de la nucela y de las formaciones nucleares accesorias, así como la posición del primordio seminal y el desarrollo del tegumento.

En la figura 1 se esquematiza el desarrollo del megagametofito en olivo, cuyos estados se describen a continuación:

#### *Megaesporogénesis* (fig. 2)

##### 1. Estado de célula arqueosporial (figs. 3a, 3b)

La esporogénesis comienza con la diferenciación de una sola célula arqueosporial, que se distingue de las demás células del tejido por su mayor tamaño y su gran núcleo. En éste se aprecia uno o más nucleolos muy refringentes. La masa, supuestamente cromatínica, es de forma redondeada o alargada y muy teñida.

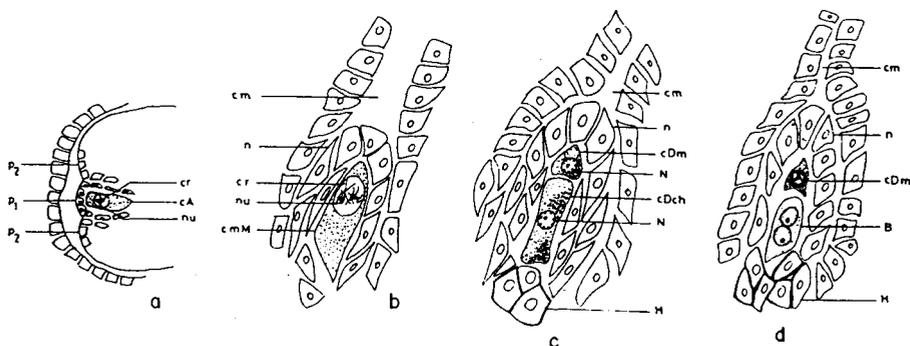


Fig. 2.—Megasporogénesis en olivo: 2a) estado de célula arquesporial; 2b) estado de célula madre de la megáspora; 2c) estado de díada; 2d) estado de bispóra. Leyenda: B, bispóra; cA, célula arquesporial; cDch, célula díada chalazal; cDm, célula díada micropilar; cm, canal micropilar; cmM, célula madre de la megáspora; cr, cromatina o cromosomas; H, hipóstasis; N, núcleo; n, nucela; nu, nucléolo; p1, protuberancia nucelar; p2, protuberancia tegumentaria (dibujo: G. Extremera).

Esta célula arquesporial se localiza inmediatamente debajo de una pequeña protuberancia de una sola capa de células, que es la primitiva nucela, producida en la superficie del primordio seminal. A ambos lados de esta protuberancia se comienzan a ver otras dos, que, tras desarrollarse, forman el tegumento envolvente del saco embrionario.

El eje mayor de la célula arquesporial viene a formar aproximadamente ángulo recto con el funículo. La coloración en el primordio seminal es homogénea.

## 2. Estado de célula madre de la megáspora (figs. 3c, 3d)

La célula arquesporial aumenta en longitud y anchura y se convierte en la célula madre del saco embrionario o de la megáspora. Su núcleo, mucho más grande ahora, se encuentra desplazado hacia uno de los extremos, normalmente el micropilar. En él se distinguen unas estructuras filamentosas en forma de bastón o en grumos pegados a la membrana que parecen ser los cromosomas, el nucleolo se muestra refringente y muy visible, el citoplasma es denso. La nucela rodea a la célula madre, pues ha aumentado bastante su número de células. Esta nucela presenta en su zona micropilar las células más voluminosas y en una sola capa, mientras que las zonas laterales están constituidas por un par de capas de células de menor tamaño. Las células de la zona chalazal se han transformado en un tejido especial: la hipóstasis, de paredes celulares gruesas, teñidas en gris oscuro y con núcleo difuso. El conjunto completo de nucela, célula madre y canal micropilar aparece predominantemente rojo, destacándose los cromosomas de color rojo oscuro y los nucleolos de un rojo brillante; las paredes celulares son de un azul tenue.

En el resto del parénquima del primordio seminal predomina el azul-verde, más intenso en las paredes celulares y más leve en el citoplasma. Los núcleos no se tiñen y los nucleolos aparecen en rojo brillante. El haz vascular que va por el funículo es predominantemente rojo.

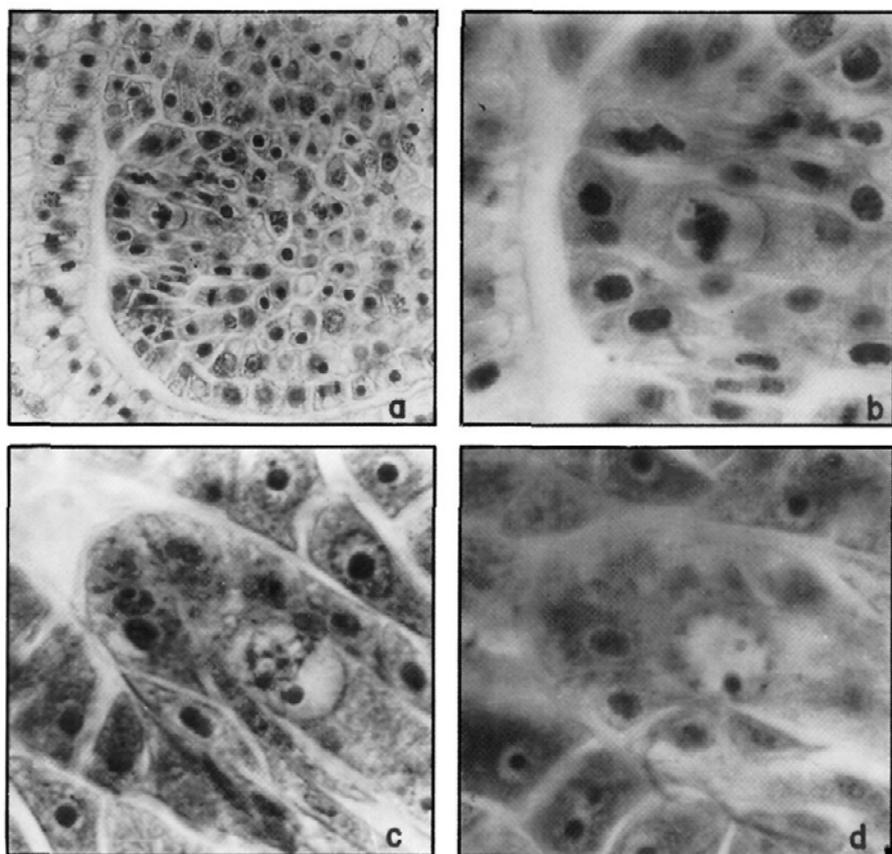


Fig. 3.—3a ( $\times 400$ ) y 3b ( $\times 1012$ ), estado de célula arquesporial: la célula arquesporial, que destaca por su mayor tamaño, gran núcleo con la cromatina hacia el extremo del núcleo próximo al nucléolo y su citoplasma denso, se encuentra bajo la protuberancia nucelar. Las otras dos protuberancias corresponden al primordio tegumentario. 3c ( $\times 1012$ ) y 3d ( $\times 1012$ ), estado de la célula madre de la megáspora: la nucela rodea a la célula madre de la megáspora, alargada con el núcleo desplazado y los cromosomas perceptibles.

A la vez que la célula madre de la megáspora aumenta de tamaño, también lo hace el primordio seminal, debido a un notorio crecimiento del tegumento, quedando el conjunto de la célula madre de la megáspora y la nucela profundizado en el interior del primordio seminal. Un canal tapizado por la epidermis se extiende desde la superficie de la nucela al extremo superior del micrópilo. En este nivel de desarrollo, el primordio seminal es ya casi anátropo.

### 3. Estado de díada (fig. 4a)

La célula madre inicia la meiosis, y como resultado de la primera división se produce la díada. Las dos células de esta díada no son iguales en tamaño y forma.

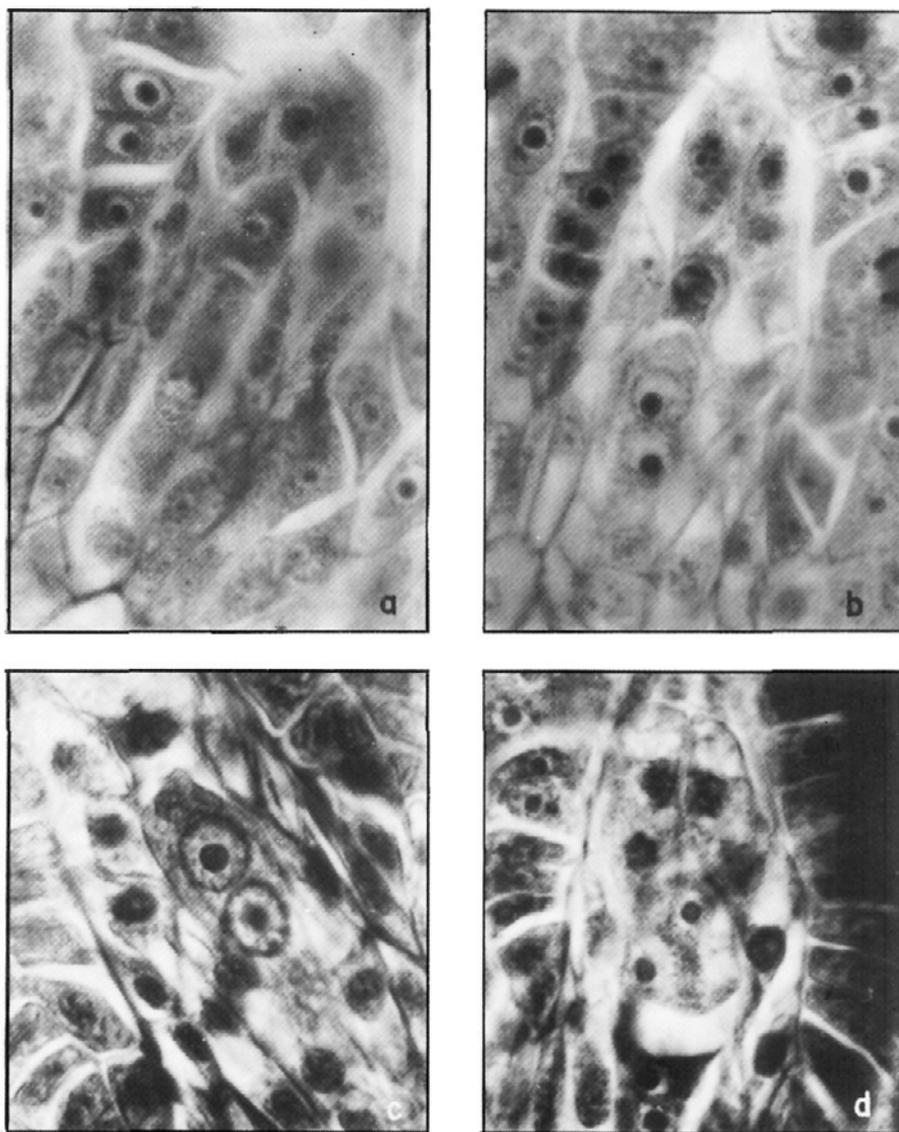


Fig. 4.—4a ( $\times 1012$ ), estado de díada: la célula díada chalazal es elongada y está flanqueada por estrechas células nucelares; la célula díada micropilar es pequeña y está cobijada por células nucelares anchas. 4b y 4c ( $\times 1012$ ), estado de la bispóra tipo *Allium*: la bispóra presenta posición chalazal; la célula díada micropilar muestra un estado inicial (4b) y un estado más avanzado —solo una mancha (4c)— de degeneración. Las células micropilares de la nucela se contraen e inician su degeneración. 4d ( $\times 1012$ ), estado de la bispóra tipo *Endymion*: la bispóra procede de la división de la célula díada micropilar; la célula díada chalazal, que ha dividido su núcleo, se muestra picnótica.

La micropilar es de menor tamaño y de forma triangular o semiesférica, mientras que la chalazal es considerablemente mayor y de forma rectangular. El núcleo de ambas es grande, con un nucleolo visible rojo refringente y unas puntuaciones rojo oscuro en su borde interior que sugieren ser la cromatina,

Se sigue observando el canal micropilar, y la posición del primordio seminal es análoga a la observada en el estado anterior. Las células epidérmicas que delimitan este canal presentan un color rojo. El primordio seminal ya ha alcanzado la posición anátropa, la cual se mantendrá hasta el final del desarrollo.

#### 4. Estado de bispóra (figs. 4a, 4c, 4d)

La célula micropilar de la díada inicia un proceso de degeneración caracterizado por una primera fase de picnosis, con un solo núcleo en su interior, aunque a veces puede presentar dos. Posteriormente, esta célula acaba convirtiéndose tan solo en un resto de color rojo intenso, en donde no se puede apreciar ningún tipo de estructuras.

La célula chalazal de la díada divide pronto su núcleo, completando así la segunda división meiótica. De este modo se forma la bispóra, pues será a partir de estos dos núcleos de donde se forme el saco embrionario completo. Estos dos núcleos de megáspora son medianamente grandes, con un nucleolo rojo refringente y con la cromatina en forma de grumos rojo-oscuros en el borde interior del núcleo. Ambos núcleos están muy próximos, incluso a veces están en contacto. El citoplasma aparece homogéneo, denso y de color verde claro.

La bispóra formada de la díada chalazal permite clasificar el desarrollo del saco embrionario en el tipo *Allium*; sin embargo, en algún caso se ha observado un desarrollo del tipo *Endymion* (fig. 4d). Éste se diferencia del anterior en que es la célula chalazal de la díada la que degenera y la micropilar es la que divide su núcleo para formar la bispóra. En todo lo demás (número de divisiones nucleares, formaciones accesorias, etc.), el desarrollo es idéntico al tipo *Allium*.

La nucela se muestra inicialmente igual que en el estado anterior. Conforme va degenerando la espóra micropilar, las células nucleares van contrayéndose y tomando un color rojo oscuro. La hipóstasis contrasta por su tono azul-verde y gruesas paredes grises.

#### *Megagametogénesis* (fig. 5)

#### 5. Estado de bispóra polarizada (fig. 6a)

Los dos núcleos de megáspora aumentan en tamaño y se separan entre sí, polarizándose cada uno en los extremos chalazal y micropilar, respectivamente, conservando conexiones citoplásmicas entre sí. Al mismo tiempo aparecen entre ambos grandes vacuolas. Simultáneamente la nucela degenera y sus células aparecen como restos filiformes o semicirculares muy teñidos de rojo. El conjunto de estos procesos da lugar a un saco embrionario de tamaño considerablemente mayor, en contacto con la epidermis interna del tegumento que lo rodea. El nucleolo y la cromatina de los núcleos siguen apareciendo igual que en el estado anterior. La hipóstasis se destaca claramente por sus células poligonales de paredes muy teñidas y citoplasma difuso.

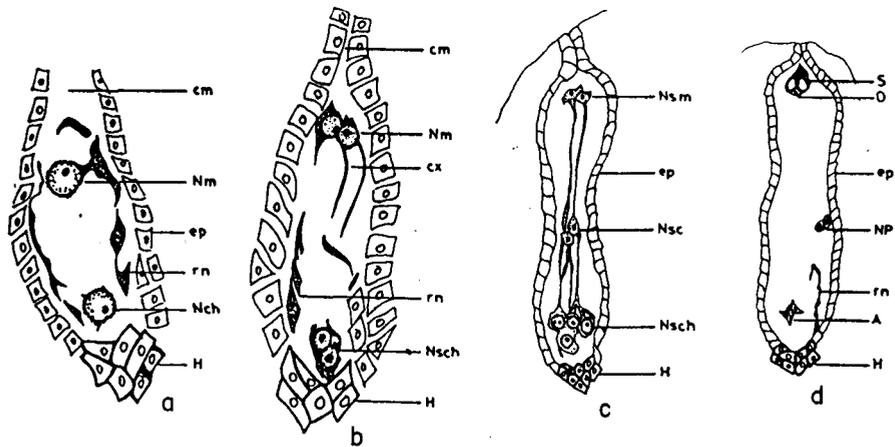


Fig. 5.—Megagametogénesis en olivo: 5a) estado de bispورا polarizada; 5b) estado de saco embrionario tetranucleado; 5c) estado de saco embrionario octonucleado inmaduro; 5d) estado de saco embrionario octonucleado maduro. Leyenda: A, antípodas; cm, canal micropilar; cx, conexiones citoplásmicas; ep, epidermis interna del tegumento; H, hipóstasis; N(s)ch, núcleo(s) chalazal(es); N(s)m, núcleo(s) micropilar(es); NP, núcleos polares; O, ovocélula; rn, restos nucelares; S, sinérgidas (dibujo: G. Extremera).

#### 6. Estado de saco embrionario tetranucleado (figs. 6b, 6c, 6d)

Como resultado de la primera mitosis se produce el saco tetranucleado. Éste es de gran tamaño, que puede variar desde el doble del binucleado hasta alcanzar casi la misma longitud que el saco maduro. Sus núcleos son de pequeño tamaño con un nucleolo de color rojo brillante. Estos núcleos se sitúan dos a dos en cada polo del saco, estando conectados por prolongaciones citoplásmicas. De la nucela solo quedan restos filiformes de color rojo oscuro en la región chalazal, que de ahora en adelante dificultarán la interpretación de esta zona del saco. La hipóstasis se destaca claramente.

#### 7. Estado de saco embrionario octonucleado inmaduro (figs. 7a, 7b)

Después de la segunda mitosis obtenemos un saco embrionario de ocho núcleos dispuestos en dos grupos de cuatro en cada mitad: la micropilar y la chalazal. Los cuatro núcleos de cada extremo se hallan envueltos en un citoplasma que se prolonga de un polo a otro, en cada uno de los cuales se pueden formar dos apretados grupos de cuatro núcleos o estar más o menos separados por parejas en la mitad chalazal y en la mitad micropilar. Este citoplasma es de un leve color verde. El nucleolo es grande, rojo y muy refrigente.

El saco alcanza prácticamente el tamaño máximo, pues llega hasta el micropilo o deja tan sólo un pequeño canal. Todo el saco se halla en contacto directo con la epidermis, cuyo borde interno se tiñe de azul grisáceo; solo perduran finos restos de nucela en la zona chalazal. La hipóstasis se hace muy evidente.

También se considera como saco inmaduro aquél con migraciones, esto es, el que posee la estructura y distribución del saco maduro descrito en el estado siguiente, pero con la diferencia de que los núcleos polares, procedentes cada uno

de un polo del saco, están aún migrando hacia el centro del mismo, suspendidos en conexiones citoplásmicas.

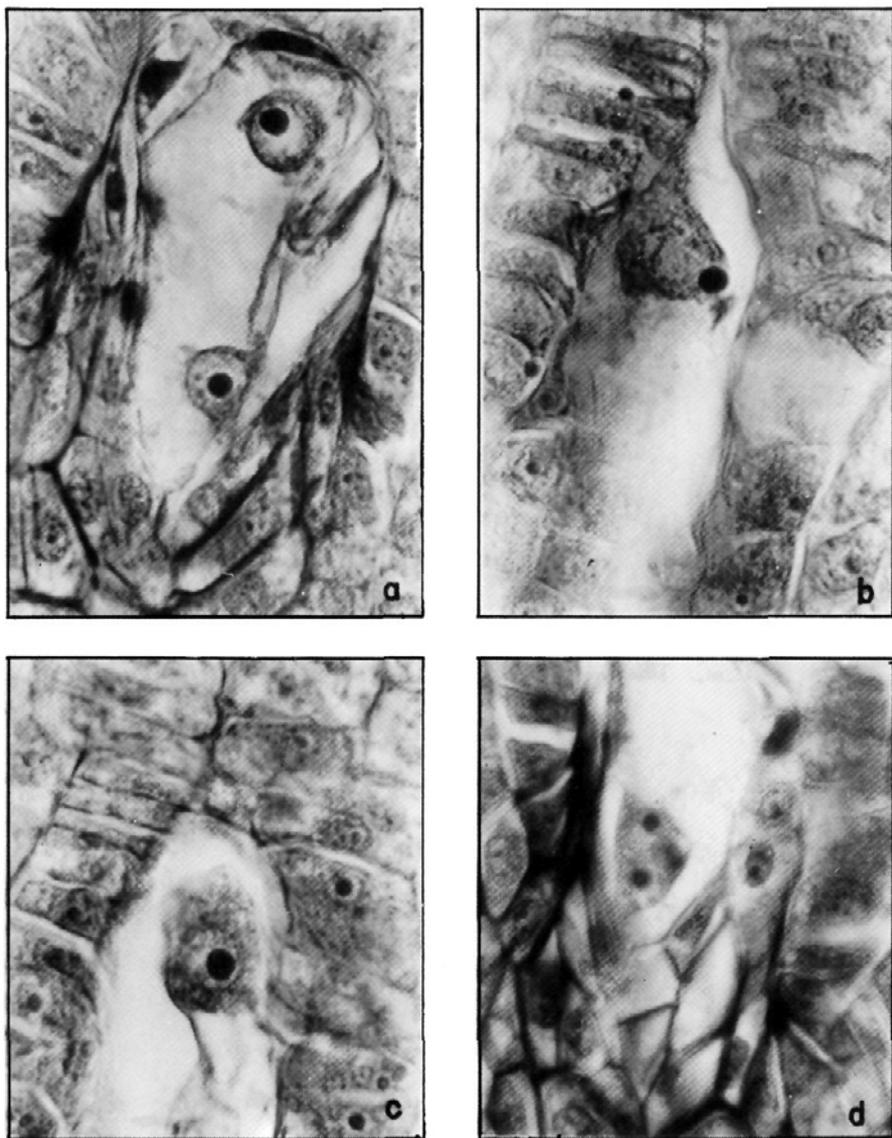


Fig. 6.—6a ( $\times 1012$ ), estado de bispورا polarizada: los núcleos de la bispورا están polarizados y presentan una gran vacuola entre ambos. Las células de la nucela están contraídas y pínóticas en la periferia del saco que ha iniciado su expansión. 6b, 6c y 6d ( $\times 1012$ ), estado de saco tetranucleado: las fotos muestran los núcleos micropilares (6b y 6c) y los dos núcleos chalazales (6d) de un mismo saco, cuyo tamaño es doble que en el estado de bispورا polarizada. Se observa claramente la hipóstasis en la zona chalazal (6d).

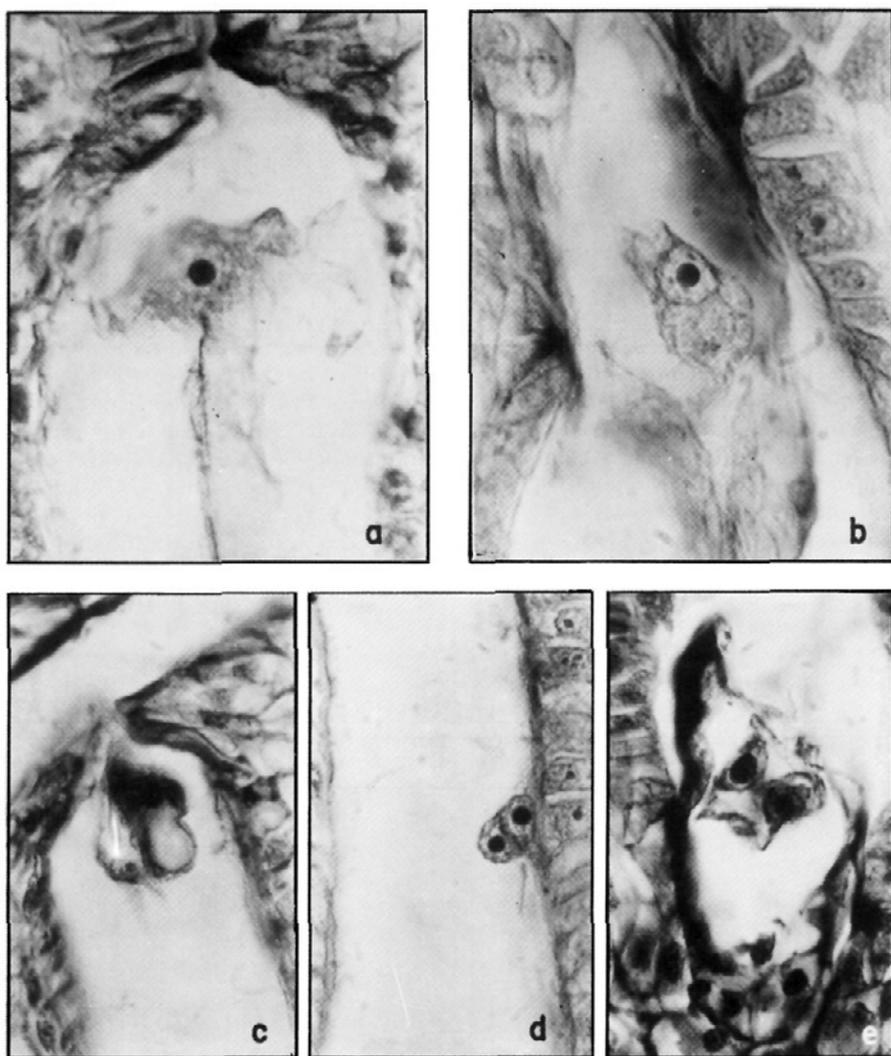


Fig. 7.—7a y 7b ( $\times 1012$ ), estado de saco octonucleado inmaduro: los núcleos presentan conexiones citoplásmicas; se muestran (7a) un núcleo micropilar y (7b) un núcleo de la zona central del saco ya completamente expandido. 7c, 7d y 7e ( $\times 736$ ). Estado de saco octonucleado maduro: se muestran (7c) la ovocélula diáfana y una sinérgida con citoplasma muy teñido y vacuola hacia el polo chalazal; 7d) los núcleos polares en contacto en el centro del saco, y (7e) dos antípodas, en primer plano, adivinándose la tercera detrás de una de las anteriores, la situada a la derecha; también se observan restos nucleares en la zona chalazal.

## 8. Estado de saco embrionario octonucleado maduro (figs. 7c, 7d, 7e)

Los ocho núcleos del estado anterior se rodean por membranas y forman siete células. En el polo micropilar se disponen tres células muy próximas entre sí, constituyendo un conjunto en forma de caperuza con el pico situado en el micrópilo. Este trío de células lo constituyen la ovocélula flanqueada por las dos sinérgidas. La ovocélula es más o menos redondeada y de aspecto diáfano; su nucleolo se tiñe de rojo refringente, con la vacuola en el polo micropilar. Las sinérgidas son de color pardo oscuro, piriformes y con una gran vacuola en el polo chalazal. El núcleo, en posición micropilar, se distingue del citoplasma por ser incoloro y presentar en el centro el nucleolo de color rojo brillante.

En el polo chalazal se sitúan las tres antípodas. Éstas son difíciles de visualizar, pues degeneran rápidamente. Presentan una morfología triangular o en forma de huso, con un nucleolo central. Se colorean en rojo no muy intenso. Con frecuencia se hallan enmascaradas por los restos de la nucela.

Algo más abajo del centro del saco se sitúan los dos núcleos polares, los cuales presentan un nucleolo rojo muy refringente. Estos núcleos se hallan en contacto, pero no fusionados, y con frecuencia pegados a la pared.

El saco está en contacto directo con la epidermis interna del primordio seminal, que se muestra fuertemente teñida de azul. La hipóstasis se destaca en la zona chalazal.

II. *Calendario del desarrollo del saco embrionario*

Es necesario reseñar que la fecha de plena floración define el día en que la mayoría de las inflorescencias (75%) tienen gran número de flores abiertas; por consiguiente, en esta fecha, como en cualquier otra del muestreo, el estado de desarrollo de cada botón floral se distribuye normalmente en torno al estado del botón medio. En el caso del olivo, la variabilidad en el estado del desarrollo de los distintos botones en esta época es notable, y ello se traduce en una variabilidad importante en las fechas en que se observan los diferentes estados de desarrollo del saco embrionario.

En estas condiciones, el desarrollo del saco embrionario ha tenido lugar en los 20 días que preceden a la fecha de plena floración del cultivar 'Manzanilla'. La duración de los períodos de observación de los estados caracterizados anteriormente (fig. 8) está determinada por el ritmo al que procede el paso de un estado al siguiente. En nuestro caso (figs. 8, 9), la preparación de la célula arqueosporial para la meiosis —estados 1 y 2— ha tenido lugar entre los 20 y los 16 días antes de anthesis. Las divisiones meióticas —paso del estado 2 al 4— han tenido lugar fundamentalmente en torno al decimosexto día anterior a la floración. A partir del estado de bispóra se inician la polarización de los núcleos, las dos divisiones mitóticas y la migración de los ocho núcleos del saco embrionario hasta que esté completa su maduración. Estos procesos son más duraderos (fig. 8) y, por consiguiente, la evolución del saco embrionario es más lenta (fig. 9).

Por otro lado, una proporción importante de botones florales han alcanzado la madurez del saco embrionario en fechas anteriores a la plena floración, incluso hasta siete días antes de la fecha (fig. 8), momento en que aún no ha abierto ningún botón floral.

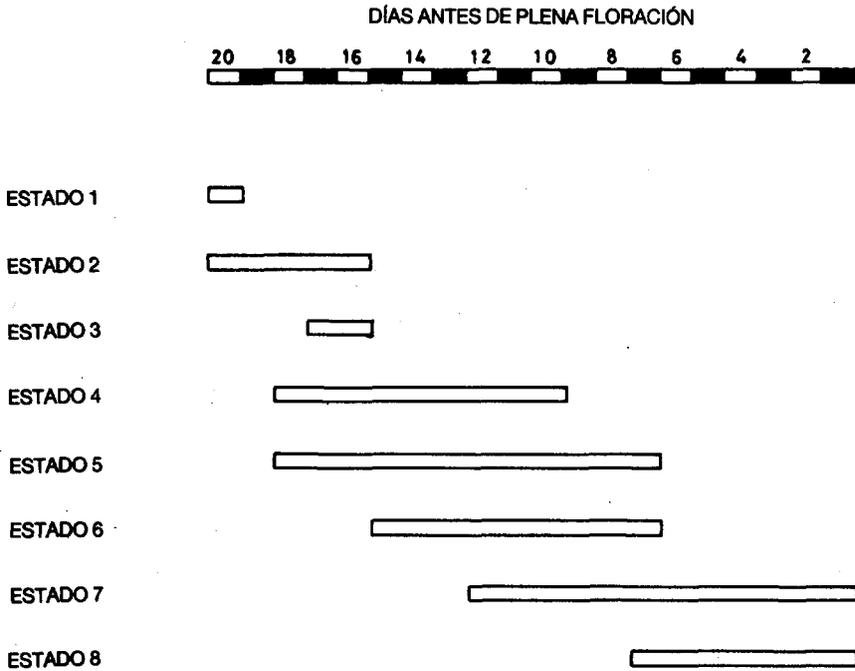


Fig. 8.—Períodos en que se han observado los estados de desarrollo del saco embrionario del olivo.

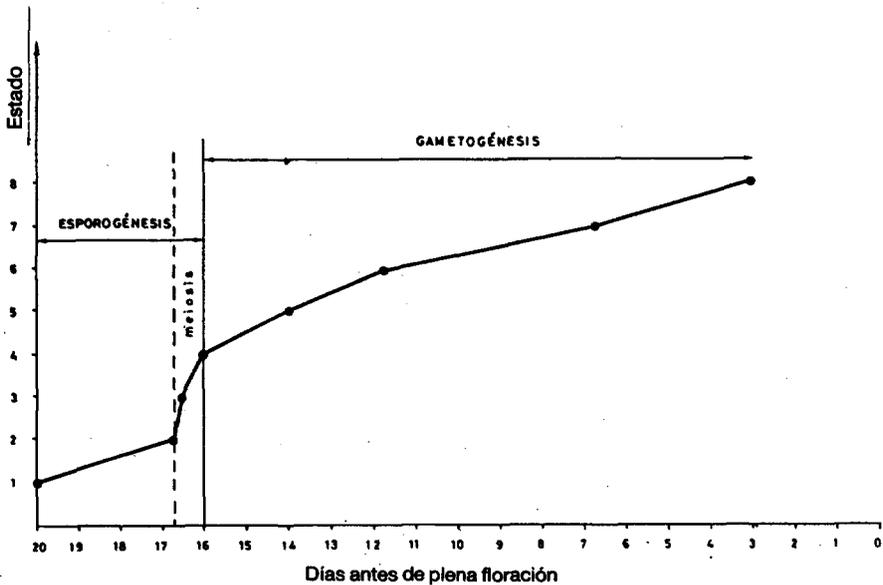


Fig. 9.—Fecha media en que los primordios seminales observados alcanzan cada estado.

## DISCUSIÓN

Las observaciones realizadas sobre un total de 235 muestras de botones florales, recogidas desde 20 días antes hasta plena floración, han permitido definir diversos estados de desarrollo durante la megaesporogénesis y la megagametogénesis (fig. 1). La megaesporogénesis se inicia con el estado de *célula arquesporial* (figs. 2, 3a, 3b), al que sigue el de *célula madre de la megáspora* (figs. 2, 3c, 3d). Tanto para KING (1938) como para MESSERI (1950) y ALTAMURA BETTI & *al.* (1982) el desarrollo comienza por una célula, redondeada o alargada, muy próxima a la superficie del primordio y bajo una protuberancia epidérmica. Sin embargo, sólo KING (1938) la denomina célula arquesporial, pues MESSERI (1950) y ALTAMURA BETTI & *al.* (1982) la llaman célula madre de la megáspora. La confusión puede proceder del hecho de que, en primordios seminales tenuinucelados, la célula arquesporial funciona directamente como célula madre de la megáspora (megasporocito) (ESAU, 1977). No obstante, las modificaciones observadas en la célula arquesporial —aumento en la longitud y anchura de la célula, crecimiento y desplazamiento del núcleo (figs. 2, 3c, 3d)— han permitido distinguir un estado de desarrollo diferenciado, coincidente con el definido como célula madre de la megáspora en diversos tratados generales (STRASBURGER, 1974; ESAU, 1977; FOSTER & GIFFORD, 1974).

A partir del estado de célula madre de la megáspora se comienza a ver una estructura procedente de la especialización del tejido nucelar chalazal, que es la llamada *hipóstasis* o *cuerpo basal nucelar* (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1975). La hipóstasis se verá ya en todos los estados restantes del desarrollo, tanto mejor conforme avanza la degeneración de la nucela (figs. 4a, 4b, 6a, 6d). TILTON (1980) considera la hipóstasis como una de las siete modificaciones de los tejidos en la zona chalazal, relacionados presumiblemente con funciones de nutrición. Ninguno de los trabajos específicos de embriología del olivo (KING, 1938; MESSERI, 1950; ALTAMURA BETTI & *al.*, 1982) hacen referencia a este tejido especial.

Tras la primera división meiótica, la célula madre de la megáspora da lugar al estado de *díada* (figs. 2, 4a). Nuestras observaciones concuerdan con MESSERI (1950), aunque difieren de las de ALTAMURA BETTI & *al.* (1982), que aseguran encontrar dos células díadas del mismo tamaño. Dos interpretaciones son posibles al respecto: *a*) que la célula díada micropilar sea menor desde el momento de la división; y *b*) que las células díadas sean inicialmente iguales y que a continuación la chalazal crezca y la micropilar se haga más apuntada. Los resultados del presente trabajo sugieren como más probable la primera hipótesis, ya que nunca se ha observado en el cultivar 'Manzanilla', cuyo saco se desarrolla normalmente, la díada con células iguales. KAPTAN (CUTTER, 1971) considera que la división desigual de células es muy importante en los procesos de diferenciación, de forma que en este caso influiría en la determinación de la espora que sobrevivirá. En el cultivar "Swan Hill", cuyo saco embrionario es anormal en anthesis (RALLO & *al.*, 1981), se han visto las díadas iguales en tamaño y forma, pero ambas células acaban por degenerar (EXTREMERA, 1985). Por otra parte, las fotografías mostradas por ALTAMURA BETTI & *al.* (1982) sugieren la posibilidad de que se trate del estado de bispóra no polarizada descrito más adelante, ya que no se observa pared alguna entre los dos núcleos en el estado que definen como díada.

La degeneración de la célula micropilar de la díada y la división del núcleo de la célula chalazal dan lugar al estado de *bíspora* (figs. 2, 4b, 4c). El estado de *bíspora* es el que caracteriza el desarrollo del saco embrionario en olivo, incluido usualmente en el tipo *Allium* (MAZZOLANI, 1973) por provenir la bíspora de la célula díada chalazal. No obstante, en muy escasas ocasiones se ha observado que la bíspora procede de la célula díada micropilar, tratándose en este caso de un desarrollo tipo *Endymion* (fig. 4d) (FOSTER & GIFFORD, 1974).

El desarrollo bispórico presenta algunas dudas a la hora de delimitar la esporogénesis de la gametogénesis, ya que por paralelismo con el tipo monospórico cabría suponer que la esporogénesis concluye con la meiosis y la gametogénesis se inicia con la primera división mitótica. Sin embargo, BATTAGLIA (1971), en un estudio detallado del saco embrionario en *Podostemaceae*, concluye que la gametogénesis (somatogénesis) empieza con la formación de vacuolas en la bíspora y la desintegración de la célula superior de la díada, además de la separación a los dos polos del saco de los núcleos de la bíspora. MESSERI (1950), ALTAMURA BETTI & al. (1982) y BATTAGLIA (1971) consideran, en el olivo, que los procesos de vacuolización y migración de núcleos sufridos en la bíspora, con su consiguiente agrandamiento, implican el comienzo de la gametogénesis. Estas observaciones sugieren que el estado de bíspora corresponde al final de la esporogénesis y que el comienzo de la gametogénesis se caracterizaría por la polarización de los núcleos. Además, los procesos previos al estado de bíspora, en particular las dos divisiones meióticas, tienen lugar en un breve lapso, siendo más lenta la posterior evolución que comporta aumento de tamaño del saco, vacuolización y migración de núcleos (figs. 8, 9). Por estas razones se ha considerado la *bíspora polarizada* (figs. 5, 6a) como un estado posterior al de *bíspora*, pues la polarización y los cambios contemporáneos indicados marcan el comienzo de la gametogénesis.

La posición anátropa se ha alcanzado plenamente en el estado de bíspora, lo que coincide con las observaciones de KING (1938). Sin embargo, MESSERI (1950) observó que la posición anátropa se alcanza en el estado de díada y ALTAMURA BETTI & al. (1982) reconocen la posición anátropa del primordio seminal en el estado de "célula madre de la megáspora redondeada", que es previo, ya que, como se ha señalado, correspondería al estado de célula arqueosporial.

Los estados de *saco tetranucleado* (figs. 5, 6b, 6c, 6d) y de *saco embrionario octonucleado inmaduro* (figs. 5, 7a, 7b) son el resultado de las dos divisiones mitóticas. La disposición de las células de éste en dos grupos de cuatro núcleos en cada polo, descrita por ALTAMURA BETTI & al. (1982), ha sido encontrada muy pocas veces en el presente trabajo, donde han aparecido generalmente tres grupos de núcleos (dos, cuatro y dos, situados en micropilo, centro y chalaza, respectivamente), que acaban completando sus migraciones hasta constituir el *saco embrionario maduro* con la clásica disposición de los núcleos.

El desarrollo del saco embrionario del cultivar 'Manzanilla' ha tenido lugar durante el período de muestreo (desde 20 días antes de plena floración hasta antes). El desarrollo megagametofítico se ha caracterizado por una rápida evolución en los procesos que comportan divisiones nucleares y un desarrollo más lento durante las fases que suponen elongación celular y migración de núcleos (figs. 8, 9). Solamente MESSERI (1950) y ALTAMURA BETTI & al. (1982) consideran la secuencia temporal de los estados de desarrollo encontrados, aunque no lleguen a esta-

blecer un calendario. De sus observaciones se deduce que los estados de elongación del saco y migración de núcleos son de mayor duración que los estados que sólo conllevan división nuclear, los cuales transcurren con mayor rapidez, tal como se ha observado en el presente trabajo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAMURA BETTI, M. M., G. PASQUA & G. MAZZOLANI (1982). Development of the female gametophyte in *Olea europaea* L. *Ann. Bot. (Rome)* 40: 111-117.
- BATTAGLIA, E. (1971). The embryosac of Podostemaceae and its interpretation. *Caryologia* 24(4): 403-420.
- BHOIWANI, S. S. & S. P. BHATNAGAR (1975). *The Embryology of Angiosperms*. Vikas Publishing House PVT LTD. (Ed.). Delhi.
- BINI, G. & M. LENSÍ (1981). Osservazioni su alcuni aspetti dell'ontogenesi fiorale nell'olivo. *Rivista Ortoflorafruttic. Ital.* 65: 371-380.
- BRADLEY, M. V. & W. H. GRIGGS (1963). Morphological evidence of incompatibility in *Olea europaea* L. *Phytomorphology* 13: 141-155.
- CUTTER, E. G. (1971). *Plant Anatomy: Experiment and Interpretation*. Part II. Addison-Wesley Publishing Company (Ed.). Reading.
- ESAU, K. (1977). *Anatomía de las plantas con semilla*. Hemisferio Sur (Ed.). Buenos Aires.
- EXTREMERA, G. (1985). *Desarrollo del saco embrionario en dos cultivares de olivo (Olea europaea L.)*. Memoria de licenciatura (inéd.). Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Córdoba.
- FOSTER, A. S. & E. M. GIFFORD (1974). *Comparative Morphology of Vascular Plants*. W. H. Freeman and Company (Ed.). San Francisco.
- JENSEN, W. A. (1962). *Botanical Histochemistry*. W. H. Freeman & Company (Ed.). San Francisco.
- JOHANSEN, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company (Ed.). New York.
- KING, J. R. (1938). Morphological development of the fruit of the olive. *Hilgardia* 11: 437-458.
- MAZZOLANI, G. (1973). A proposito del gametofito femminile di *Olea europaea* L. *Ann. Bot. (Rome)* 32: 127-128.
- MESSERI, A. (1950). Alcuni dati sulla embriologia ed embriogenesi di *Olea europaea* L. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.* 57: 149-169.
- RALLO, L., G. C. MARTIN & S. LAVÉE (1981). Relationship between Abnormal Embryo Sac Development and Fruitfulness in Olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106(6): 813-817.
- STRASBURGER, E. (1974). *Tratado de Botánica*. Marín, S. A. (Ed.). Barcelona.
- TILTON, U. R. (1980). Hypostase development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and notes on other types of modifications in the chalaza of angiosperm ovules. *Canad. J. Bot.* 58: 2059-2066.

Accepted for publication: 15-II-1988