

EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS PARA ESTIMAR LA CALIDAD DEL POLEN EN DISTINTOS CULTIVARES DE OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.)

*Evaluation of different methods to determine pollen quality
in several olive (*Olea europaea* L.) cultivars*

REJÓN, J. D.; SUÁREZ, C. G.; ALCHÉ, J. D.; CASTRO, A. J. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín (CSIC). C/ Profesor Albareda, 1. 18008 Granada. España. mariaisabel.rodriquez@eez.csic.es

Recibido: 2010-11-24; Aceptado: 2010-12-24

RESUMEN: La calidad del polen es un parámetro de gran utilidad en estudios agro-biológicos y que incluye tanto la viabilidad como la capacidad de germinación del grano de polen. En el caso del polen del olivo (*Olea europaea* L.) tiene especial interés para seleccionar cultivares polinizadores. En este trabajo se han analizado los siguientes métodos para evaluar la calidad del polen: a) tinción con azul tripán, b) reacción fluorocromática con diacetato de fluoresceína y c) capacidad de germinación *in vitro* del polen. Los resultados obtenidos indican que los dos últimos son los métodos más efectivos para la estimación de la calidad del polen, y han permitido clasificar los cultivares estudiados de acuerdo con su carácter polinizador potencial.

PALABRAS CLAVE: calidad del polen, diacetato de fluoresceína (DAF), azul tripán, germinabilidad, olivo, *Olea europaea*, viabilidad del polen.

SUMMARY: Pollen quality is a useful parameter for agrobiological studies, which includes both the viability and the capacity of the pollen grain to germinate. In the case of the olive (*Olea europaea* L.) pollen, such parameter is of particular interest for the selection of pollen donor cultivars. In this work we have compared several methods to evaluate the quality of pollen, including: a) trypan blue staining, b) the fluorochromatic reaction of the fluorescein diacetate, and c) the germination ability of pollen *in vitro*. The results obtained

indicate that the two latter methods were the most effective to estimate olive pollen quality, and allowed us to classify the cultivars studied according to their pollinating potential.

KEYWORDS: pollen quality, fluorescein diacetate (FDA), trypan blue, germinability, olive, *Olea europaea*, pollen viability.

INTRODUCCIÓN

La calidad del polen es un parámetro fundamental para los estudios relacionados con la biología de la polinización, ya que existen numerosos procesos esenciales para la mejora genética y la producción de los cultivos que dependen de este parámetro (selección de variedades polinizadoras, reconocimiento polen-pistilo, germinación y crecimiento del tubo polínico y fertilización) (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1984; DAFNI & FIRMAGE, 2000).

El concepto de «calidad del polen» ha sido un término controvertido utilizado indistintamente para referirse a viabilidad y/o germinabilidad. Viabilidad es, a su vez, un término ambiguo (BERNHARDT *et al.*, 1980; SMITH-HUERTA & VASEK, 1984; MORSE, 1987; VAUGHTON & RAMSEY, 1991; NIESENBAUM, 1992; NYMAN, 1992; LINDGREN *et al.*, 1995). LINCOLN *et al.* (1982) definieron la «viabilidad» como la capacidad que tiene un grano de polen de vivir, crecer, germinar y desarrollarse, mientras que «germinabilidad» se define como la capacidad que tiene el grano de polen de emitir el tubo polínico en condiciones adecuadas (DAFNI & FIRMAGE, 2000). Por otro lado, STANLEY & LINSKENS (1974) introdujeron el concepto de «longevidad polínica» como el período de tiempo que el polen conserva la capacidad de

germinar sobre un estigma receptivo y compatible. Puede ocurrir que un grano de polen sea viable y, sin embargo, no llegue a germinar (*in vitro* o *in vivo*) debido a que las condiciones no sean las adecuadas. También puede suceder que tenga la capacidad de germinar y, sin embargo, no llegue a fertilizar al óvulo debido a que exista un problema de incompatibilidad polen-pistilo (DAFNI & FIRMAGE, 2000). Por tanto, se puede considerar que la calidad del polen es la capacidad que tiene el grano de polen de ser funcional e incluye viabilidad y germinabilidad.

La viabilidad del polen está determinada por diversos factores internos y externos o medioambientales (Fig. 1). Entre los factores internos, específicos de la especie, destacan la duración de la microsporogénesis, la variabilidad genética interespecífica, el metabolismo del polen, etc. (HORMAZA & HERRERO, 1999; NIKKANEN *et al.*, 2000). Entre los factores externos o ambientales encontramos la temperatura, el grado de humedad, etc. (STANLEY & LINSKENS, 1974; STONE *et al.*, 1995; FERRI *et al.*, 2008).

La evaluación de la calidad del polen se puede realizar mediante diversos métodos, tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo los primeros más exactos y fiables. Sin embargo, los test *in vitro* son los más usados ya que son más sencillos

y rápidos de realizar. Entre los métodos *in vitro* más utilizados para evaluar la calidad del polen cabe destacar: a) técnicas de tinción para observar el contenido citoplasmático –carmin acético, orceína acética, etc.–, b) test enzimáticos –bencidina, sales de tetrazolio, etc.–, c) métodos combinados que permiten determinar la integridad de la membrana plasmática y la presencia de actividad enzimática –reacción fluorocromática mediante diacetato de fluoresceína, DAF– y d) test de germinabilidad. Los tres primeros son específicos para evaluar viabilidad y el último indica la capacidad de germinación del polen, por lo que la elección de un método u otro dependerá de la especie objeto de estudio, de la correlación entre viabilidad y germinabilidad y de los objetivos finales del trabajo que se va a realizar. Estos métodos han sido aplicados frecuentemente al polen de diferentes especies (KELEN & DEMIRTAR, 2003; MURUVVET *et al.*, 2007; COVEY *et al.*, 2010). Sin embargo, son relativamente escasos los trabajos realizados sobre viabilidad y germinabilidad del polen de olivo en los diferentes cultivares (FERNÁNDEZ-ESCOBAR *et al.*, 1981; ROVIRA & TOUS, 2005; FERRI *et al.*, 2008; PINILLOS & CUEVAS, 2008), a pesar de la gran utilidad de estos test para la selección de variedades polinizadoras de esta especie de enorme interés agronómico.

El olivo (*Olea europaea* L.) es una de las especies cultivadas de mayor antigüedad en el mundo. Este hecho, junto a la facilidad de la multiplicación vegetativa, la selección de plantas por los olivicultores, la polinización cruzada, la mutación y la selección clonal

han contribuido al elevado número de variedades de esta especie en el mundo (BARRANCO *et al.*, 2004). La base de datos de la FAO en su última revisión (BARTOLINI *et al.*, 2005) señala la presencia de más de 1.200 variedades autóctonas de olivo, mientras que RALLO *et al.* (2005) indican que el número de variedades de olivo en el mundo llegan a las 2.000. Esta diversidad, junto al enorme interés agronómico de esta especie, hace necesaria la caracterización y selección de aquellas variedades que presentan un mayor rendimiento para la polinización y de aquí la utilidad de este estudio.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar las ventajas e inconvenientes de diversos test para determinar la calidad del polen de diferentes cultivares de olivo. Los métodos aquí evaluados han sido:

a) La tinción con azul tripán, también conocida como método de exclusión del azul tripán. Se basa en que el colorante no puede pasar dentro de la célula al tener ésta la membrana plasmática intacta. Por tanto, los granos viables no se tiñen mientras que, cuando el plasmalema está dañado, el colorante sí penetra uniéndose a las proteínas presentes dentro de la célula. El resultado es que los granos no viables se tiñen de color azul-violeta intenso. Generalmente esta tinción ha sido utilizada en estudios de viabilidad de células cultivadas (HOU & LIN, 1996; GRATÃO *et al.*, 2008) y recientemente ha sido aplicada en estudios de viabilidad polínica (comunicación personal de la Dra. Ilda Norohna en Oporto, Portugal).

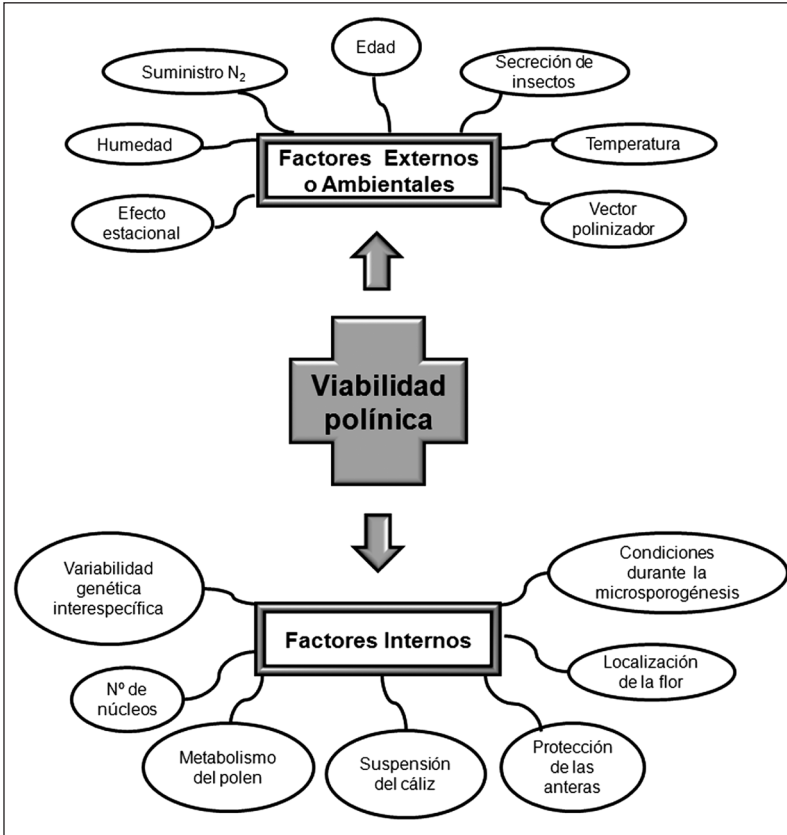


FIGURA 1. Factores que afectan a la viabilidad del polen (esquema modificado a partir de DAFNI & FIRMAGE, 2000).

b) La reacción fluorocromática mediante DAF (HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1970) es uno de los métodos más ampliamente utilizados en el estudio de la viabilidad del polen. El DAF es un éster apolar, lo que le permite su paso a través de la membrana hidrofóbica de la célula viva. Una vez dentro, el éster es hidrolizado por enzimas esterasas, dejando

libre la fluoresceína, fluorocromo que cuando se excita con una longitud de onda adecuada (490 nm) emite fluorescencia de color verde brillante. Como la fluoresceína tiene una baja permeabilidad debido a su carácter polar, no puede salir a través del plasmalema, y queda retenida, acumulándose en aquellas células con el plasmalema bien conservado.

Como consecuencia, sólo los granos de polen con niveles de actividad esterasa adecuados y con el plasma-
lema integro mostrarán fluorescencia
verdosa, indicativa de que estos granos son viables.

- c) Germinación *in vitro* para evaluar la capacidad de germinación del polen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal: En este trabajo se ha utilizado polen maduro de olivo (*Olea europaea* L.) correspondiente a las variedades Arbequina, Bella de España, Hojiblanca, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla, Picual, Picudo, Galega y Gordal, procedente de árboles caracterizados pertenecientes a la colección de germoplasma de olivo del IFAPA «Venta del Llano» Mengíbar, Jaén. El polen fue recolectado durante el período de antesis (mayo y junio) del año 2010 mediante embolsado previo de las ramas. Tras la recolección, el polen fue purificado a través de membranas de nailon con diámetro de poro de 150 μm y 50 μm y utilizado inmediatamente en los distintos ensayos. Con objeto de que los resultados de los test pudieran ser comparables, todos los ensayos se realizaron a partir del mismo material.

Viabilidad del polen: La viabilidad del polen de los distintos cultivares de olivo se estimó mediante la tinción con azul tripán y mediante el test de la reacción fluorocromática con diacetato de fluoresceína. En el primer caso, se adaptó el protocolo descrito por GRATÃO *et al.* (2008).

Se preparó una solución de trabajo de azul tripán (Fluka, Switzerland) a partir de una solución madre al 0,4% (p/v) en PBS (*phosphate buffered saline*) mediante dilución 1:1 con el mismo tampón, a la que se le añadió una pequeña cantidad de polen (0,02 g) y se mezcló bien. A continuación se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se agitó suavemente la mezcla y se pusieron 100 μl en un portaobjetos que se cubrió con un cubreobjetos. Seguidamente se analizó al microscopio óptico (Zeiss Axioplan, Alemania).

Para realizar la prueba de la reacción fluorocromática con DAF, se siguió el método establecido por HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, en 1970, con algunas modificaciones: se preparó una solución de trabajo mezclando 45 μl de solución concentrada de diacetato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 5 mg/ml en acetona, y 1,5 ml de sacarosa al 15% (p/v). A continuación se tomaron 100 μl de la solución de trabajo, a los que se añadieron 0,02 g de polen. Tras agitar suavemente la mezcla e incubar 5 min en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan, Alemania) equipado con un juego de filtros LP450-490, FT510, LP520.

Germinación *in vitro*: Los granos de polen fueron germinados en el medio descrito por BREWBAKER y KWACK (1963) con modificaciones. Previamente, el polen fue hidratado durante 60 min en una cámara húmeda a 30 °C y en oscuridad. A continuación, las muestras (0,02 g) fueron transferidas a 5 ml de medio

de germinación con sacarosa al 10% (p/v), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ al 0,03% (p/v), KNO_3 al 0,01% (p/v), MgSO_4 al 0,02% (p/v), ácido bórico al 0,01% (p/v) y polietilenglicol al 5% (p/v). Las placas se incubaron a 25 °C durante 6 h en agitación suave y en oscuridad. Una vez germinado el polen, el recuento se efectuó en un microscopio óptico (Zeiss Axioplan, Alemania). El porcentaje de granos de polen germinados se calculó mediante la fórmula: $(\text{n.}^\circ \text{ granos germinados/n.}^\circ \text{ total de granos}) \times 100$. Se consideraron como granos de polen germinados aquellos en los que la longitud del tubo fuese al menos dos veces el diámetro del grano de polen. No fueron contabilizados como granos germinados aquellos en los que el tubo polínico presentó claras anomalías como citoplasma ensanchado, tubos rotos, etc.

Análisis estadísticos: En todos los test realizados, tanto de viabilidad como de germinabilidad, se contaron un total de 1.000 granos de polen (200 granos x 5 repeticiones independientes). Los test estadísticos se realizaron con el programa SPSS v. 17.0.0 y las gráficas se hicieron usando el programa SigmaPlot v. 11.0. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron: U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis (χ^2) y el test de correlación de Spearman (ρ).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tinción de azul tripán y la reacción fluorocromática permiten diferenciar fácilmente los granos viables y no viables cuando éstos aparecen intensamente

teñidos. No obstante, existe un porcentaje de granos que se tiñen débilmente o cuya fluorescencia es muy reducida (Fig. 2), por lo que es necesario definir unos criterios de selección para distinguir entre granos viables y no viables. Así, para el método del azul tripán, se han considerado granos viables aquellos que no tienen coloración alguna y los no viables aquellos que presentan algún grado de coloración. En el caso del método del diacetato de fluoresceína, sólo aquellos granos cuya intensidad de fluorescencia es muy elevada (en torno al 90-100%) han sido estimados como viables y no viables el resto, aunque emitan alguna fluorescencia. Existen métodos de cuantificación de la fluorescencia que permiten definir el límite entre granos viables y no viables de una manera exacta e incluso semiautomática, por ejemplo, mediante programas de análisis de imágenes (PLINE *et al.*, 2002a).

Los valores de viabilidad obtenidos con ambos métodos para una misma muestra de polen fueron significativamente diferentes (Mann-Whitney, $U = 254,000$, $p = 0,004$) (Fig. 3). En todos los cultivares analizados, la tinción con azul tripán dio valores más altos de viabilidad que el DAF, lo cual indica una menor especificidad, que podría atribuirse a que únicamente analiza la integridad de las membranas del grano, mientras que el método del DAF evalúa tanto la integridad de las membranas como la actividad esterase del grano.

También se observaron diferencias significativas en la viabilidad del polen entre las 10 variedades ensayadas con ambos métodos (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 25,984$, $p = 0,002$ para el azul tripán

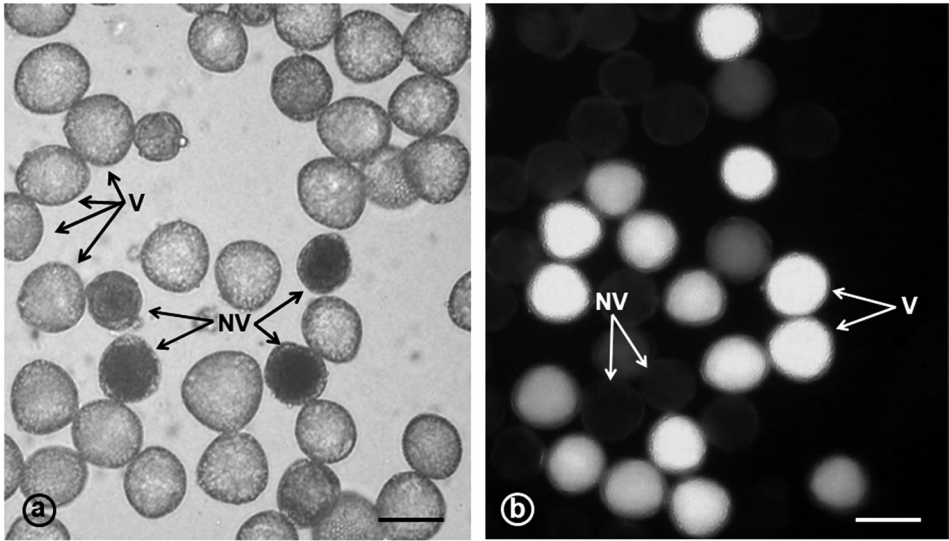


FIGURA 2. Test de viabilidad del polen de olivo. a) Test de exclusión del azul tripán observada a microscopía óptica. Los granos de polen viables (V) están sin teñir y los no viables (NV) teñidos de azul-violeta. b) Reacción fluorocromática del diacetato de fluoresceína observada con microscopía de fluorescencia (DAF). Los granos de polen viables (V) muestran fluorescencia verde intensa, mientras que los no viables (NV) sólo presentan una ligera autofluorescencia. Barras = 25 µm.

y $\chi^2 = 27,696$, $p = 0,001$ para DAF) (Fig. 3). Con el test de azul tripán, la viabilidad se situó entre el valor mínimo del cultivar Gordal (3,2%) y el máximo de Manzanilla de Sevilla (92,6%), mientras que los valores obtenidos con el método del DAF estuvieron comprendidos entre el 0,72% de Galega y el 87,3% de Arbequina. En el caso de las variedades Bella de España y Hojiblanca, las diferencias entre ambos métodos fueron máximas (el 79,21% con azul tripán frente al 36,77% con DAF).

Los distintos cultivares analizados fueron agrupados en función de la viabilidad del polen, siguiendo los criterios

previamente establecidos por ROVIRA & TOUS (2005). Así, las variedades Picual, Arbequina, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Lucio y Loaime presentan una alta viabilidad (viabilidad > 50%), mientras que Picudo, Gordal y Galega tienen una viabilidad baja (<25%). La variedad Bella de España, dependiendo del método utilizado, presenta distintos valores de viabilidad: alta con azul tripán y media con DAF (25 < viabilidad < 50). Este hecho indica que es recomendable el uso de al menos dos pruebas de viabilidad diferentes con objeto de que los resultados reflejen de forma más exacta la calidad del polen, tal y

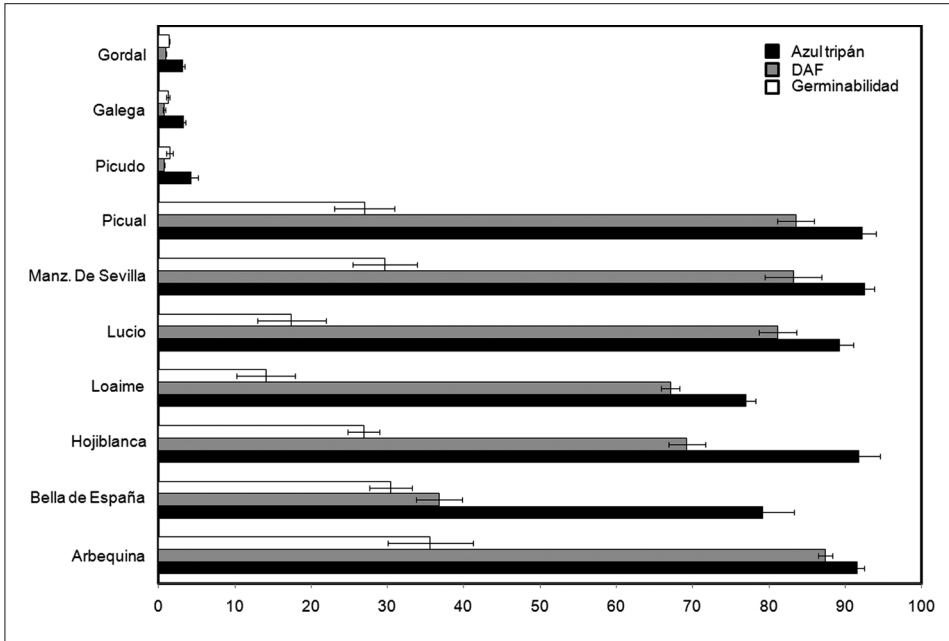


FIGURA 3. Comparación de los test de viabilidad del polen (azul tripán y diacetato de fluoresceína, DAF) y de germinabilidad en distintos cultivares de olivo.

como ha sido sugerido por otros autores (RODRÍGUEZ-RIANO & DAFNI, 2000). La clasificación indicada podría constituir un criterio inicial tanto para la selección de los mejores polinizadores, como para descartar algunas de las variedades indicadas para este uso, debido a su pobre rendimiento potencial.

En cuanto al porcentaje de germinación, los resultados obtenidos muestran la existencia de diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 26,225$, $p = 0,002$) en la capacidad de germinación de los distintos cultivares, oscilando entre el 42,1% de Arbequina y el 1,4% de Galega (Fig. 3). Estos datos coinciden con otros estudios previos que muestran diferencias de

hasta un 30% en la capacidad de germinar del polen de diferentes cultivares de olivo (FERNÁNDEZ-ESCOBAR *et al.*, 1981; FERRI *et al.*, 2008). La relativamente baja germinabilidad del polen de olivo en comparación con otras especies (ASLANTUS & PIRLAK, 2002; PERVEEN & KHAN, 2007; PINILLOS & CUEVAS, 2008; KHAN & PERVEEN, 2009) ha sido atribuida a diversas anomalías en el polen (PACINI *et al.*, 1978) e incluso a la presencia de partículas virales durante el desarrollo del polen (PACINI & CRESTI, 1977). Este bajo porcentaje de germinación podría verse compensado en el olivo por el elevado número de granos de polen que se liberan de las anteras, aunque también

es cierto que un cultivar puede producir mucho polen y, sin embargo, el cuajado del fruto sea mínimo, debido a una baja calidad de su polen o a problemas de incompatibilidad polen-pistilo.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los factores óptimos de la germinación en un medio *in vitro* nunca van a ser iguales a los de la germinación en el pistilo y por tanto el porcentaje que se obtenga siempre será diferente al que en realidad se tiene en la flor *in situ*. Estas diferencias han quedado demostradas en estudios comparativos de germinación *in vitro* con respecto a estudios de germinación en el pistilo de la flor (STANLEY & LINSKENS, 1974), en presencia de tejidos estigmáticos (LAVEE & DATT, 1978) o de extracto de pistilos (FERNÁNDEZ-ESCOBAR *et al.*, 1981), lo que demuestra la dificultad que existe de establecer las condiciones óptimas de germinación en un medio artificial. También hay que tener en cuenta que los porcentajes de germinación de este estudio se han obtenido mediante el método tradicional de conteo. Este método está limitado por el reducido tamaño de la población objeto del recuento y por la subjetividad del investigador que realiza el conteo, lo que frecuentemente se traduce en una sobrestimación de la tasa de germinación (RODRÍGUEZ-GARCÍA *et al.*, 2009).

Al comparar los valores de viabilidad obtenidos con el método del DAF y los valores de germinabilidad (Fig. 3), se observa que el porcentaje de viabilidad generalmente siempre es mayor que el de germinabilidad, lo que indica que no todos los granos de polen viables llegan a germinar. En el caso de que ambos

valores estén muy próximos, como ocurre en la variedad Bella de España, prácticamente todos los granos que son viables también germinan, lo que indica que el polen es de buena calidad. En cambio, las variedades de Arbequina, Hojiblanca, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla y Picual presentan unos valores de viabilidad aproximadamente el triple que los de germinabilidad, lo que sugiere que el polen de estas variedades es de calidad media, ya que sólo un tercio de los pólenes viables van a germinar. Teniendo en cuenta que para todos los ensayos se utilizó polen procedente del mismo vial se deduce que las diferencias encontradas entre cultivares deben ser atribuidas principalmente a factores genéticos, aunque otros factores como la edad del árbol también podrían influir. Finalmente, se ha determinado que existe una correlación estadísticamente significativa entre germinabilidad y ambos test de viabilidad, tras calcular el coeficiente de correlación Rho de Spearman (ρ) ($\rho = 0,720$, $p = 0,000$ para DAF; $\rho = 0,716$, $p = 0,000$ para azul tripán), lo que ya había sido comprobado en otros estudios (DAFNI & FIRMAGE, 2000) para la reacción fluorocromática.

En resumen, los test de viabilidad son métodos más rápidos y sencillos que el método de germinación, pero también son menos restrictivos. Se puede concluir que para evaluar la calidad del polen es recomendable la realización de un test de viabilidad, preferentemente el DAF, y un test de germinabilidad, ya que ambos se complementan, aportando una información más real sobre el potencial del polen para llevar a cabo su función.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2008-00517/AGR y BFU 2008-00629 (Ministerio de Ciencia e Innovación) y por la Consejería de Ciencia y Tecnología de la Junta de Andalucía (Grupo de Investigación BIO283). J. D. Rejón agradece al Ministerio de Ciencia e Innovación la concesión de una beca/contrato FPU. Los autores agradecen a Conchita Martínez y Carmen María Salmerón su colaboración técnica en la recolección de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- ASLANTUS, R. & PIRLAK, L. (2002): Storage of Strawberry pollen. *In*: M. HIETARANTA *et al.* (eds.), *IV International Symposium on strawberry pollen, Acta Horticulturae*, 2: 567.
- BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. & RALLO, L. (2004): *El cultivo del olivo*. 5.^a edición. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- BARTOLINI, G.; PREVOST, G.; MESSERI, C. & CARIGNANI, G. (2005): *Olive germplasm: cultivars and world-wide collections*. FAO/Plant Production and Protection Division. Rome. Available at: <http://www.apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp>.
- BERNHARDT, P.; KNOX, R. B. & CALDER, D. M. (1980): Floral biology and self-incompatibility in some Australian mistletoes of the genus *Amyema* (Loranthaceae). *Austr. J. Bot.*, 28: 437-451.
- BREWBAKER, J. L. & KWACK, B. H. (1963): The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.*, 50: 859-865.
- COVEY, A. P.; SUBBAIAH, C. C.; PARSONS, R. L.; PEARCE, G.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A.; RYAN, C. A. & BEDINGER, P. A. (2010): A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. *Plant. Physiol.*, 153: 703-715.
- DAFNI, A. & FIRMAGE, D. (2000): Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant. System. Evol.*, 222: 113-132.
- FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; GÓMEZ-VALLEDOR, G. & RALLO, L. (1981): *In vitro* pollen germination in olive cultivars. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, 15: 261-272.
- FERRI, A.; GIORDANI, G.; PADULA, E. & BELLINI, E. (2008): Viability and *in vitro* germinability of pollen grains of olive cultivars and advanced selections obtained in Italy. *Adv. Hort. Sci.*, 22: 116-122.
- GRATÃO, L. P.; POMPEU, G. B.; CAPALDI, F. R.; VITORELLO, V. A.; LEA, P. J. & AZEVEDO, R. A. (2008): Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 94: 73-83.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. (1970): The evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: Intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, 45: 115-120.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K. R. (1984): The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 367-375.
- HORMAZA, J. I. & HERRERO, M. (1999): Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma*, 208: 129-135.
- HOU, B. H. & LIN, C. G. (1996): Rapid optimization of electroporation conditions for soybean and tomato suspension cultured cells. *Plant. Physiol.*, 111: [Suppl] 2, 166.
- KELEN, M. & DEMIRTAR, I. (2003): Pollen viability, germination capability and pollen production level of some grape varieties

- (*Vitis vinifera* L.). *Physiol. Plant.*, 25: 229-233.
- KHAN, S. A. & PERVEEN, A. (2009): Pollen germination capacity of three mango cultivars *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) from Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 41: 1009-1012.
- LAVEE, S. & DATT, Z. (1978): The necessity of cross-pollination for fruit set of Manzanillo olives. *J. Hort. Sci.*, 53: 261-266.
- LINCOLN, R. J.; BOXSHALL, G. A. & CLARK, P. F. (eds.) (1982): *A dictionary of ecology, evolution and systematic*. Cambridge University Press. New York.
- LINDGREN, D.; PAULE, L.; XIHUAN, S.; YUAZDANI, R.; SEGERSTÖRM, O.; WALLIN, J. E. & LEZBRO, M. L. (1995): Can viable pollen carry Scots pine genes over long distances? *Grana*, 34: 64-69.
- MORSE, D. H. (1987): Roles of pollen and ovary age in follicle production of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Amer. J. Bot.*, 74: 851-856.
- MURUVVET, I.; FUAT, E. & SEMIH, C. (2007): Viability, germination and amount of pollen in selected caprifig types. *Pak. J. Bot.*, 39: 9-14.
- NIESENBAUM, R. A. (1992): Sex ratio, components of reproduction and pollen deposition in *Lindera benzoin* (Lauraceae). *Amer. J. Bot.*, 79: 495-500.
- NIKKANEN, T.; ARONEN, T.; HÄGGMAN, H. & VENÄLÄINEN, M. (2000): Variation in pollen viability among *Picea abies* genotypes-potential for unequal paternal success. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 511-518.
- NYMAN, I. (1992): Pollination mechanisms in six *Campanula* species (Campanulaceae). *Plant. Syst. Evol.*, 188: 97-108.
- PACINI, J. & CRESTI, M. (1977): Viral particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta*, 137: 1-4.
- PACINI, E.; CRESTI, M.; CIAMPOLINI, F. & BINI, G. (1978): Vitalità presenza di amielo, anomalie morfologiche nel polline di 148 cultivars di olivo. In: S. SANSARINE (eds.), *La fertilità nelle piante da frutto*: 643-654. Società orticola Italiana. Bologna.
- PERVEEN, A. & KHAN, S. A. (2009): Maintenance of pollen germination capacity of *Glycine max* (L.) merr. (Papilionaceae). *Pak. J. Bot.*, 41: 2083-2086.
- PINILLOS, V. & CUEVAS, J. (2008): Standardization of the fluorochromatic reaction test to assess pollen viability. *Biotech. & Histochem.*, 83: 15-21.
- PLINE, W. A.; EDMISTEN, K. L.; OLIVER, T.; WILCUT, J. W.; WELLS, R. & ALLEN, N. S. (2002a): Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. *Crop. Sci.*, 42: 2193-2200.
- RALLO, L.; BARRANCO, D.; CABALLERO, J. M.; DEL RÍO, C.; MARTIN, A.; TOUS, J. & TRUJILLO, I. (eds.) (2005): *Variedades de olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; REJÓN, J. D.; ALCHÉ, J. D. & CASTRO, A. J. (2009): Measurement of olive pollen *in vitro* germination rates using flow cytometry. *Ezzaitouna Revue*. The Olive Tree Institute Publisher. Sfax, Túnez (en prensa).
- RODRÍGUEZ-RIANO, T. & DAFNI, A. (2000): A new procedure to assess pollen viability. *Sex. Plant. Reprod.*, 12: 241-244.
- ROVIRA, M. & TOUS, J. (2005): Producción y viabilidad del polen. In: L. RALLO *et al.* (eds.), *Variedades de olivo en España*: 295-300. Mundi Prensa, MAPA y Junta de Andalucía. Madrid.
- SMITH-HUERTA, N. L. & VASEK, F. C. (1984): Pollen longevity and stigma pre-emption in *Clarkia*. *Amer. J. Bot.*, 71: 1183-1191.
- STANLEY, R. G. & LINSKENS, H. F. (1974): Viability Test. In: R. G. STANLEY & H. F. LINSKENS (eds.), *Pollen-biology, biochemistry and management*: 67-86. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

- STONE, J. L.; THOMSON, J. D. & DENT-ACOSTA, S. J. (1995): Assessment of pollen viability in hand pollination experiments: a review. *Am. J. Bot.*, 82: 1186-1197.
- VAUGHTON, G. & RAMSEY, M. (1991): Floral biology and inefficient pollen removal in *Banksia spinulosa* var. *neoangelica* (Proteaceae). *Aust. J. Bot.*, 39: 167-177.