

DEVELOPMENT OF POLLEN GRAIN AND ANTHHER WALL OF *Tigridia pavonia* (L.F.) D.C.

Aida Carrillo-Ocampo^a, H. Araceli Zavaleta-Mancera^{b*}, E. Mark Engleman^{b†}

^aÁrea de Biología, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México- Texcoco, 56230, Edo. México, México.

^bBotánica Estructural, Posgrado en Botánica, Colegio de Posgraduados, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Km. 36.5 Carretera México- Texcoco, 56262, Edo. México, México.

*Corresponding autor, E-mail: arazavaleta@gmail.com

Received: 21-06-2023
Published: 27-09-2023

Accepted: 13-09-2023

ABSTRACT

Tigridia pavonia (Iridaceae), is a monocot native to the Americas, little is known about its reproductive biology. The aim of this work was to study the ontogeny of pollen grains and the anther wall. The first stages of floral development occur within underground bulbs that were obtained from wild plants in the State of Mexico. The anthers at different stages of development were processed for optical microscopy and scanning electron microscopy. Tetrahedral and isobilateral tetrads occurred during microsporogenesis, and meiosis I occurred within the bulb; this process is asynchronous in the same anther, in the same flower and in the same inflorescence. The tapetum is secretory with protuberances at the tetrad stage. Pollen grains are bisulcate, curvurate and they dispersed in clusters joined by pollenkit and viscin threads, an uncommon feature in monocotyledons. The pollen exine is reticulate intectated, heterobrocated and curvurate, fused pili, and numerous basal spicules in the form of granules. At anthesis, pollen grain still binucleated. The anther wall begins with a protodermis and parietal primary cells, were the subepidermal cells showed periclinal division, forming the endotecio and the intermediate strata (3-4), later these cells collapse and the endotecio develop helicoidal and reticular cell wall thickening. The epidermis of the anther has anomocytic stomata and reticulated cuticle, each theca develops a dorsal rib with epidermal cells with raised walls. This is the first anatomical description of pollen and anther development for the tribe Tigridieae and for *T. pavonia*.

Keywords: Iridaceae; Tigridieae; wall-anther; microsporogenesis; pollen.

DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN Y PARED DE LA ANTERA DE *Tigridia pavonia* (L.F.) D.C.

RESUMEN

Tigridia pavonia (Iridaceae), es una monocotiledónea nativa del continente americano, poco se sabe sobre su biología reproductiva. El objetivo de este trabajo fue estudiar la ontogenia de los granos de polen y la pared de la antera. Las primeras etapas del desarrollo floral ocurren dentro de bulbos subterráneos que se obtuvieron de plantas silvestres en el Estado de México. Las anteras en diferentes etapas de desarrollo se procesaron para microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Durante la microsporogénesis se produjeron tétradas tetraédricas e isobilaterales, y la meiosis I ocurrió dentro del bulbo; este proceso es asíncrono en la misma antera, en la misma flor y en la misma inflorescencia. El tapete es secretor con protuberancias en la etapa de tétrada. Los granos de polen son bisulcados y se dispersan en grupos unidos por polenkit e hilos de viscina, una característica poco común en las monocotiledóneas. La exina es intectada reticulada, heterobrocada y curvimurada, pili fusionados, y numerosas espículas basales en forma de gránulos. En la antesis, el polen permanece binucleado. La pared de la antera inicia con una protodermis y células parietales primarias, donde el estrato subepidérmico se divide periclinalmente dando origen al endotecio y a los estratos intermedios (3-4), más tarde estos los cuales después se aplastan y el endotecio desarrolla engrosamientos helicoidales y reticulares. La epidermis de la antera tiene estomas anomocíticos y cutícula reticulada, cada teca desarrolla una costilla dorsal con células epidérmicas con paredes elevadas. Esta es la primera descripción anatómica del desarrollo del polen y la antera para la tribu Tigridieae y para *T. pavonia*.

Palabras claves: Iridaceae; Tigridieae; pared-antera; microsporogénesis; polen.

INTRODUCCIÓN

Tigridia pavonia es una monocotiledónea del continente americano que ha recibido especial atención, por sus flores

grandes (10-15 cm de diámetro) [1]. Los tépalos muestran colores vistosos, de patrones moteados que sugieren el pelaje de un ocelote, de ahí el nombre nahuatl "oceloxochitl". Desde tiempos precolombinos las flores se han usado en liturgias y como ornato, y los bulbos como alimento y medicina [2] *T. pavonia* pertenece a la familia Iridaceae, subfamilia Iridoideae, tribu Tigridieae, subtribu Tigridiinae. Iridaceae es una de las familias monofiléticas más grandes del orden Asparagales [3]. La tribu Tigridieae abarca los 500-2,800 m de altitud, 15-30° de latitud y 92-109° de longitud, región que incluye a 25 estados de la República Mexicana [4].

A partir de la evolución y diversidad de las funciones y el desarrollo de la antera en angiospermas es posible entender las relaciones entre la diferenciación celular y la degeneración de tejidos en la pared de la antera con el origen y desarrollo del polen [5], [6]. Existe variación en el tipo de desarrollo de la pared de la antera y del grano de polen entre familias de un mismo orden [7] y entre especies de una misma familia [8]. Dentro de la familia Iridaceae, se ha encontrado desarrollo de la pared de la antera tipo dicotiledóneo [9], [10], [11] y monocotiledóneo [12], así como un tipo de citocinesis intermedio [13]. Estas observaciones todavía no son bien comprendidas [14], [15]. No se halló ningún estudio sobre el desarrollo de la pared de la antera y desarrollo del grano de polen de la tribu Tigridieae y tampoco del género *Tigridia*. En la literatura consultada solo se encontró la descripción del grano de polen maduro realizada en cinco colectas mexicanas de *T. pavonia*, en donde destacan la variación en la forma, tamaño, y microestructura de la pared del polen de esta especie [16]. La terminología utilizada para la descripción palinológica es muy amplia, en el presente artículo se basó en [17]. El endotecio de 44 especies de Iridaceae, de las cuatro subfamilias y sus principales tribus fueron revisados, pero el género *Tigridia* no está incluido [18]. Estos autores encontraron que el patrón de variación del endotecio permitió establecer relaciones entre tribus y géneros que concordaran con la

filogenia propuesta para Iridaceae [19]. A partir del siglo XX ha habido un creciente interés por estudiar la biología de la antera tanto para entender su desarrollo, como para fines prácticos de mejoramiento de cultivos mediante ingeniería genética [20]. Algunos autores [21], [22] coinciden en que es indispensable un mejor conocimiento del desarrollo del polen y de la antera, así como de los mecanismos que controlan la infertilidad masculina para la generación de semillas híbridas y para evitar flujo de polen entre distintas variedades. En México se han descrito nueve variedades silvestres de *T. pavonia* [2]. La microscopía Electrónica de Barrido (MEB) proporciona información detallada estructural que la Microscopía de Luz (ML) no aporta. La presente investigación es un estudio original acerca del desarrollo del grano de polen y pared de la antera de *T. pavonia*, mediante técnicas de ML y MEB, con el propósito de obtener información sobre las características anatómicas e histológicas de los tejidos involucrados en estos procesos, a fin de aportar conocimiento de las estructuras reproductoras masculinas, que permita comprender la biología reproductiva de la familia Iridaceae.

MATERIALS AND METHODS

Material biológico

Se obtuvieron bulbos subterráneos de plantas completas (Fig. 1 A) creciendo en forma natural en una huerta en descanso ubicada en San Miguel Tlaixpan, Texcoco, Estado de México, 19°31'10" N y 99°48'45" O, a 2,405 msnm. Temperatura anual máxima 22.8°C, mínima 7.3°C; precipitación media anual 586.7 mm. (Datos de 1951-2010, Estación 00015101, Comisión Nacional del Agua, CONAGUA) [23]. Se depositaron ejemplares herborizados con número de registro 36230, en el Herbario-Hortorio, Jorge Espinosa Salas, de la Universidad Autónoma Chapingo. El desarrollo de la antera inicia en el interior del bulbo subterráneo condición que imposibilitó el marcaje de las inflorescencias y asignación de edades (Fig. 1. A). Para este trabajo se asignaron 7 estados de desarrollo basados en la anatomía:

cambios en el número de estratos de la pared y su relación con las etapas del desarrollo del grano de polen. De manera preliminar se realizaron 14 muestreos de bulbos de *T. pavonia*, cada 5-8 días, de junio a agosto (estación de lluvias) desde la formación de la yema de la inflorescencia hasta la dehiscencia de la antera y liberación de los granos de polen. El muestreo significó el sacrificio del bulbo completo, el cual contiene una sola yema de inflorescencia con varios (2-5) primordios florales de los cuales se seleccionó el más desarrollado. En cada fecha de muestreo, la morfología de la planta se fotografió y relacionó con cada una de las etapas de desarrollo del grano de polen. Esta información fue útil debido a que, en una misma fecha, las poblaciones de *T. pavonia* presentaron individuos con diferentes estados de crecimiento y desarrollo (Fig. 1 A).



Fig. 1. Plantas de *Tigridia pavonia* en estadio de yema floral. A, Plantas jóvenes con 2-3 nófilos, con yemas florales jóvenes dentro del bulbo enterrado bajo el suelo (Etapa 0 y 1). B, Flor en antesis con tépalos moteados. C, Estambres monadelfos con anteras aplanadas grandes (1.5 cm), basifijas, extrorsas, con dehiscencia longitudinal y polen expuesto. D, Meristemo de inflorescencia (flecha azul) y tallo en forma de disco (di) y los catafilos fueron removidos.

Microscopía de Luz

Primordios florales y sus anteras en diferentes etapas de desarrollo fueron disectados y fijados en solución FAA (10 % formalina, 5% ácido acético glacial, 50% etanol y 35% agua) [24] por 24 h. Después de un lavado en agua destilada se preservaron en solución GAA (glicerol 25% v/v, etanol 50% v/v, agua 25% v/v). Las muestras se

procesaron para su inclusión en parafina [25] con la ayuda de un cambiador automático de tejidos (Tissue Maraton, USA). Cortes (8-10 μ m), transversales a la antera y seriados, obtenidos en un micrótopo rotatorio (American Optical, USA) fueron teñidos con safranina O y verde fijo (FCF); con estas tinciones las paredes celulósicas tiñen de azul verde, las paredes lignificadas y los núcleos de rojo, y el citoplasma de morado o verde-azul [26]. También se realizaron tinciones específicas para polisacáridos insolubles, con ácido peryódico-reactivo de Schiff (APS) y para proteínas con azul negro de naftol (ANN) [27]. La lignina se detectó con 2% floroglucinol en etanol 96% y HCl 50% [25]. La presencia de polenkit se determinó en aplastados de granos de polen en una gota de agua entre un portaobjetos y cubreobjetos, la presencia de gotas lipídicas se observó con un microscopio óptico [28]. Los cortes fijos se observaron y fotografiaron en un fotomicroscopio Axioscop 2 Plus con una cámara Axioacam 5Rc (Carl Zeiss, Alemania).

Microscopía Electrónica de Barrido

Anteras maduras se fijaron en una solución de 3% glutaraldehído en amortiguador de fosfato Sorensen (pH 7.2, 0.1 M) por 24 h [24]. Los tejidos se lavaron dos veces en el amortiguador de fosfatos Sorensen y se deshidrataron en etanoles graduales (de 30%, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 %) durante 45 min en cada cambio y luego se desecaron, en una desecadora de punto crítico modelo Samdri 795 (Tousimis, Maryland U.S.A.). Las muestras desecadas se montaron en porta muestras de latón con cinta de cobre doble adhesiva y se recubrieron con oro-paladio (80-20) en una ionizadora de metales Fine Ion Sputter (JFC-1100, JEOL, Japón). Los tejidos fueron observados en un microscopio electrónico de barrido (JSM 6390, JEOL Japón) operado a 15 kV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El muestreo de las etapas tempranas y la reconstrucción de los eventos involucrados en la ontogenia y desarrollo de

las partes reproductivas de *T. pavonia* resultó complejo porque las primeras etapas del desarrollo del primordio de inflorescencia ocurren dentro del bulbo subterráneo (Fig. 1. A - D) y no contamos con información previa sobre indicadores morfológicos externos para guiar la recolecta en campo. En *T. pavonia* se encontró desarrollo asincrónico incluso entre anteras de una misma flor. En este estudio el desarrollo de la antera se dividió en 7 etapas con base en cambios significativos observados en la formación del grano de polen y su relación con el desarrollo de la pared de la antera.

ETAPA 0. (5 y 14 de junio) La antera tiene cuatro lóbulos no prominentes formados por células meristemáticas con alta actividad mitótica. Al centro se observó tejido esporógeno (Fig. 2 A). Las células de la protodermis presentaron divisiones anticlinales, y debajo de estas hay células parietales primarias (pp) que presentaron divisiones periclinales, las cuales dará origen a endotecio y a los estratos intermedios (Fig. 3 A y 4 A). Estudios con microscopía confocal en maíz (*Zea mays*) demostraron que, en vista longitudinal de un lóbulo de la antera, hay formación simultánea de una columna central de células esporógenas, desde la punta hasta la base del lóbulo, mientras que las divisiones periclinales de las células parietales es estocástica [29] esto explica la dificultad de dar seguimiento puntual a este tipo de divisiones.

ETAPA 1 (14 y 20 de junio). Inicia la diferenciación de las células madre de microsporas (2n), las cuales se caracterizaron por su mayor tamaño, forma, paredes delgadas, citoplasma denso y núcleos prominentes (Fig. 2. B). En esta etapa ya existe una diferenciación de los estratos de la pared de la antera. De acuerdo con observaciones en la Etapa 0, las divisiones observadas en las parietales primarias (externas) estas dan origen a endotecio y los estratos intermedios (3-4) y las parietales secundarias internas (ps) desarrollarán el tapete (Fig. 4 A, B). Este tipo de desarrollo es similar al de las monocotiledóneas, pero nos inclinamos por no definir el

tipo de desarrollo de la pared de la antera de *T. pavonia* por las complejidades técnicas ya anotada [7]. Hace falta revisar etapas intermedias, con muestreos con intervalos en horas para afirmar el tipo de desarrollo monocotiledoneo en esta especie. Por su parte el género *Iris*, se reportó como tipo de desarrollo de la pared de la antera tipo dicotiledóneo [11] Un muestreo en intervalo de horas aportaría datos relevantes para su caracterización.

ETAPA 2 (21 y 25 de junio). Ocurre un notable aumento del número y volumen en las células madre de microsporas, que han desarrollado una vacuola notoria. En el tejido conectivo, el haz vascular no está diferenciado y se presenta como procambium (Fig. 2 C). Los estratos de la pared de la antera se han diferenciado en epidermis, un estrato subepidérmico que dará origen al endotecio, 2-3 estratos intermedios, algunos con vacuolas grandes, y un estrato interno, el tapete con numerosas vacuolas pequeñas y citoplasma denso (Fig. 4 C). Al final de esta etapa las células del tapete se alargan en sentido radial.

ETAPA 3 (27 de junio y 8 de julio). La inflorescencia joven (25 mm de longitud), está aún dentro del bulbo subterráneo. Sucede la meiosis I en las células madre de las microsporas (Fig. 2. D). En *Crocus* spp. [30] y en *Hymenocallis caribaea* [31] también se encontró que la meiosis de los microsporocitos ocurre cuando la inflorescencia joven se encuentra aún dentro de los bulbos subterráneos. En corte transversal los lóbulos adaxiales de la antera fueron más grandes que los abaxiales. En esta etapa las células epidérmicas tienen paredes tangenciales externas ligeramente convexas y anticlinales en zig-zag; los estratos intermedios aumentaron a 3-4 hileras, por divisiones periclinales y la capa intermedia adosada al tapete presenta paredes delgadas con vacuolas grandes. Hay un estrato de tapete con numerosas vacuolas y citoplasma denso (Fig. 4 D).

En *Allium sativum* (clon Piemonte) también se reportó vacuolización de las células del tapete en esta misma etapa de desarrollo [32].

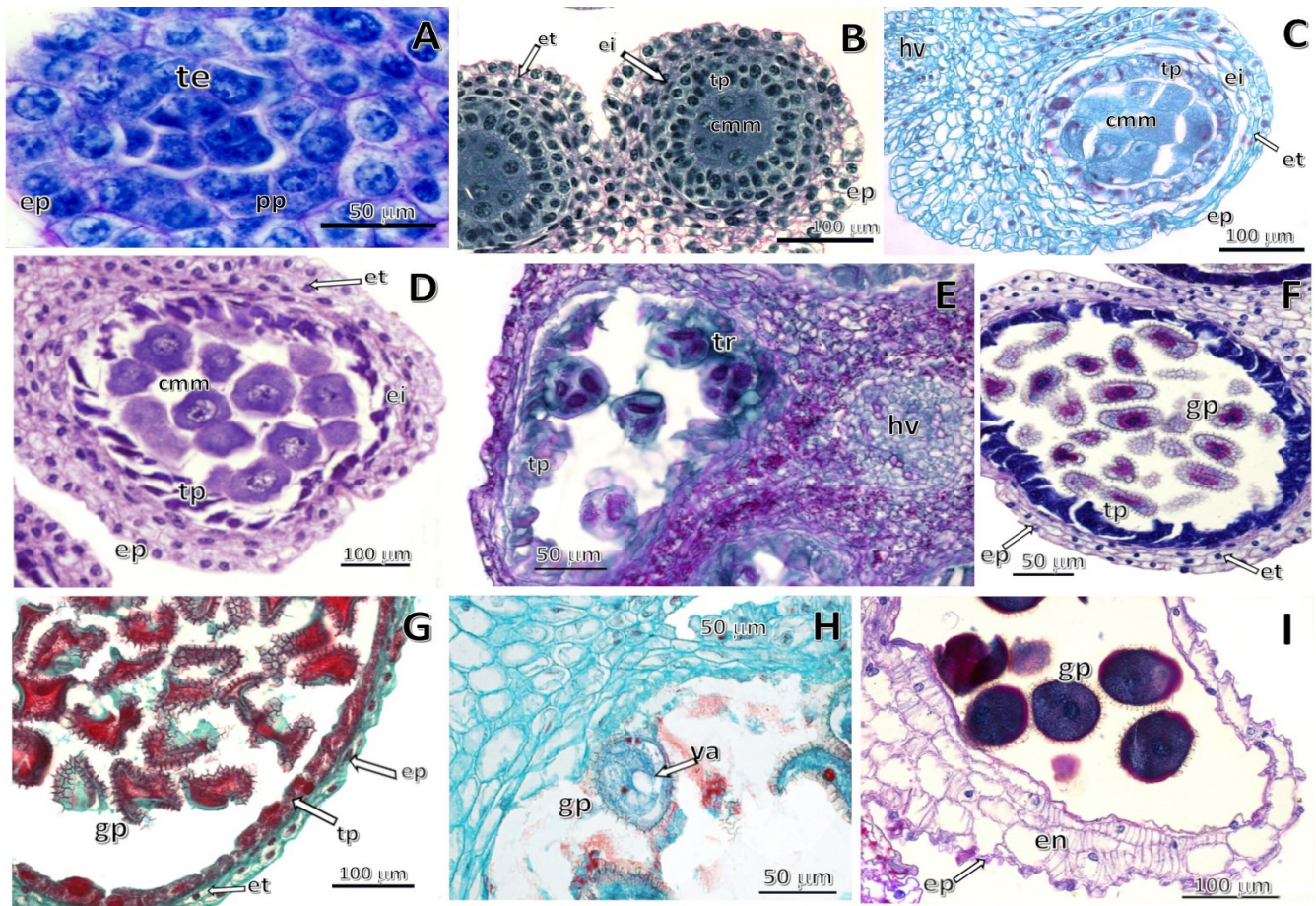


Fig. 2. Desarrollo del grano de polen de *Tigridia pavonia*. A, Etapa 0, tejido esporógeno y células parietales primarias; B, Etapa 1, inicia la formación de las células madres de las microsporas; C, Etapa 2, maduración de las cmm; D, Etapa 3, la meiosis I de los microsporocitos; E, Etapa 4, meiosis II y formación de tétradas tetraédricas y decusadas; F, Etapa 5, separación de las microsporas libres mononucleadas o granos de polen joven, la pared de calosa se ha degradado (1n); G, Etapa 5, inicio del colapso del tapete; H, Etapa 6, Microsporas vacuoladas; I, Etapa 6 avanzada, engrosamiento de la pared del endotecio, grano de polen con exina e intina. cm, células madre de las microesporas; ep, protodermis o epidermis; ei, estratos intermedios; gp, granos de polen joven; hv, haz vascular, pp, células parietales primarias, tp, tapete; tr, tétradas; v, vacuola.

ETAPA 4 (15 y 20 de julio). En este periodo ocurre la meiosis II de las células madres de las microsporas. La visible porque la cubren las vainas de los hipsófilos caulinares o brácteas. Las tétradas se cubren de calosa y los núcleos se encuentran rodeados de numerosos granos de almidón teñidos de color rosado con APS. Se detectaron dos tipos de tétradas, tetraédricas e isobilaterales, en un mismo lóculo de la antera (Fig. 2. E). Se sugiere citocinesis simultánea, ya que no observamos la diada en ninguna de las muestras revisadas; al respecto se indica que esto puede deberse a la dirección de la formación de

inflorescencia ha emergido del suelo y mide de 15-30 cm (dependiendo de la altura de la planta) pero ésta no es paredes durante la citocinesis [33]. Existen evidencias de que en las monocotiledóneas es común la citocinesis sucesiva, la cual da lugar a un mayor número de tipos de tétradas (tetragonales, isobilaterales, romboidales, lineares, decusadas, con forma "T"); pero también ocurre la citocinesis simultánea que forma tétradas tetraédricas y decusadas, y un tipo intermedio que forma tétradas irregulares debidas a la orientación del huso acromático durante la meiosis II [34].

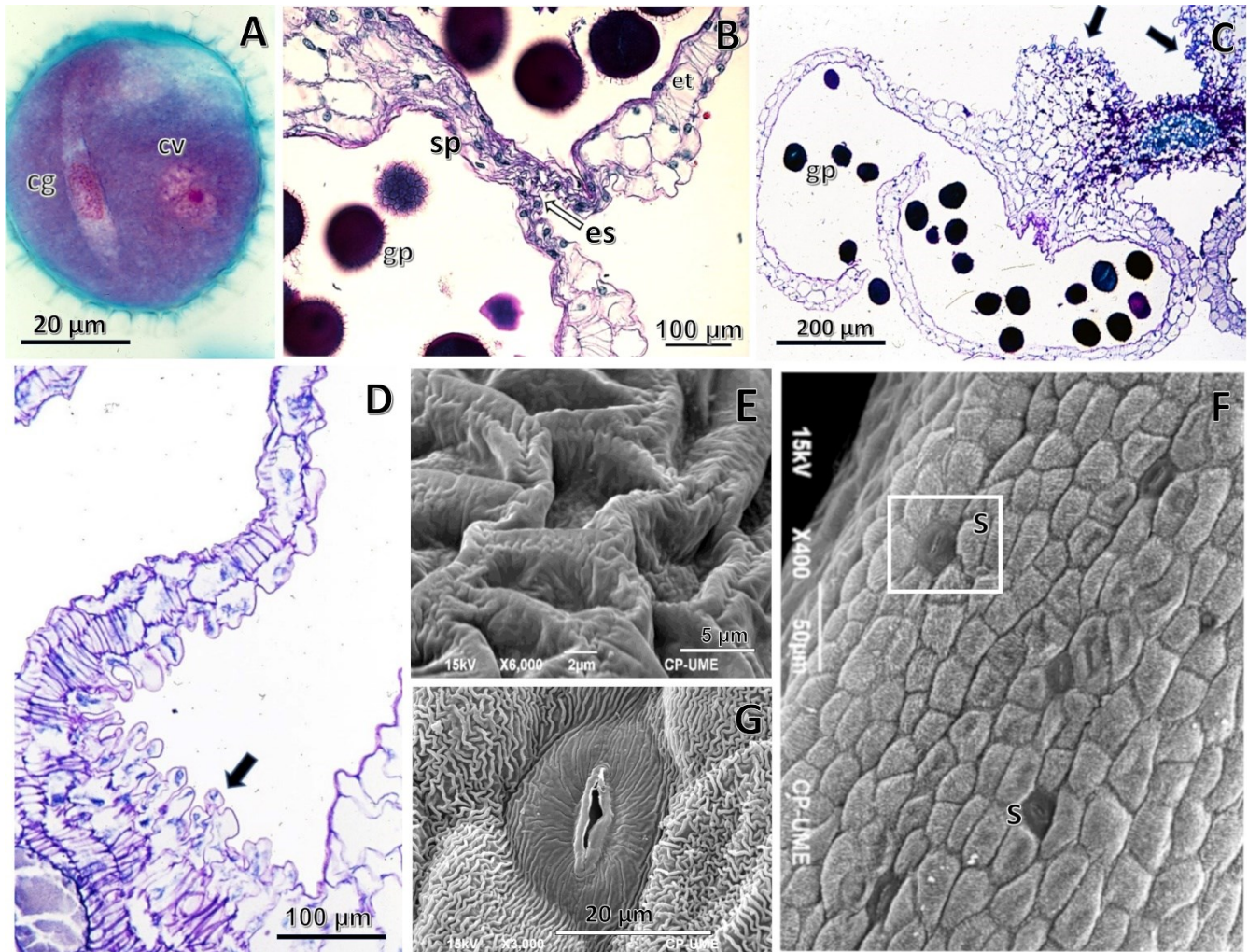


Fig. 3. Antera y grano de polen maduro (Etapa 7). A; grano de polen bicelular, B; colapso de septo y estomio; C, rompimiento del septo y estomio; D, protuberancias en las células epidérmicas de las costillas dorsales del conectivo indicadas por flechas; E, MEB de las protuberancias epidérmicas del conectivo; F, pared de la antera con estomas anomocíticos, sin células acompañantes; G, detalle de las estomas de la pared de la antera, muestra la textura reticulada de la cutícula. de las tecas. cg, célula generatriz; cv, célula vegetativa, es, estomio; ep, epidermis; et, endotecio; gp, granos de polen; s, estoma; st, estomio; sp, septo. Flechas negras muestran las protuberancias de la epidermis del conectivo.

Las células del tejido conectivo y de las paredes de la antera presentan numerosos granos de almidón (APS). En la pared de la antera, dos estratos intermedios se aplastan, las células del estrato más cercano al tapete tienen paredes muy delgadas y vacuolas más grandes que en la etapa anterior (Fig. 4 D). En el tapete hay células que se alargan en sentido tangencial y otras en sentido radial y forman protuberancias que invaden el lóculo, y en algunas regiones las protuberancias abrazan las tétradas de

microsporas (Fig. 4 D). Cambios similares se observaron en el tapete secretor de *Crocus sativus* [35], en *Aloe jucunda* y en *Aloe lateritia* en esta misma etapa [36].

Es posible que el tapete de *T. pavonia* tenga un tipo desarrollo intermedio, entre secretor y periplasmodial, esto debido al cambio de forma que sufren sus células [37]. Hacia el final de esta etapa, la calosa de las tétradas inician su degradación.

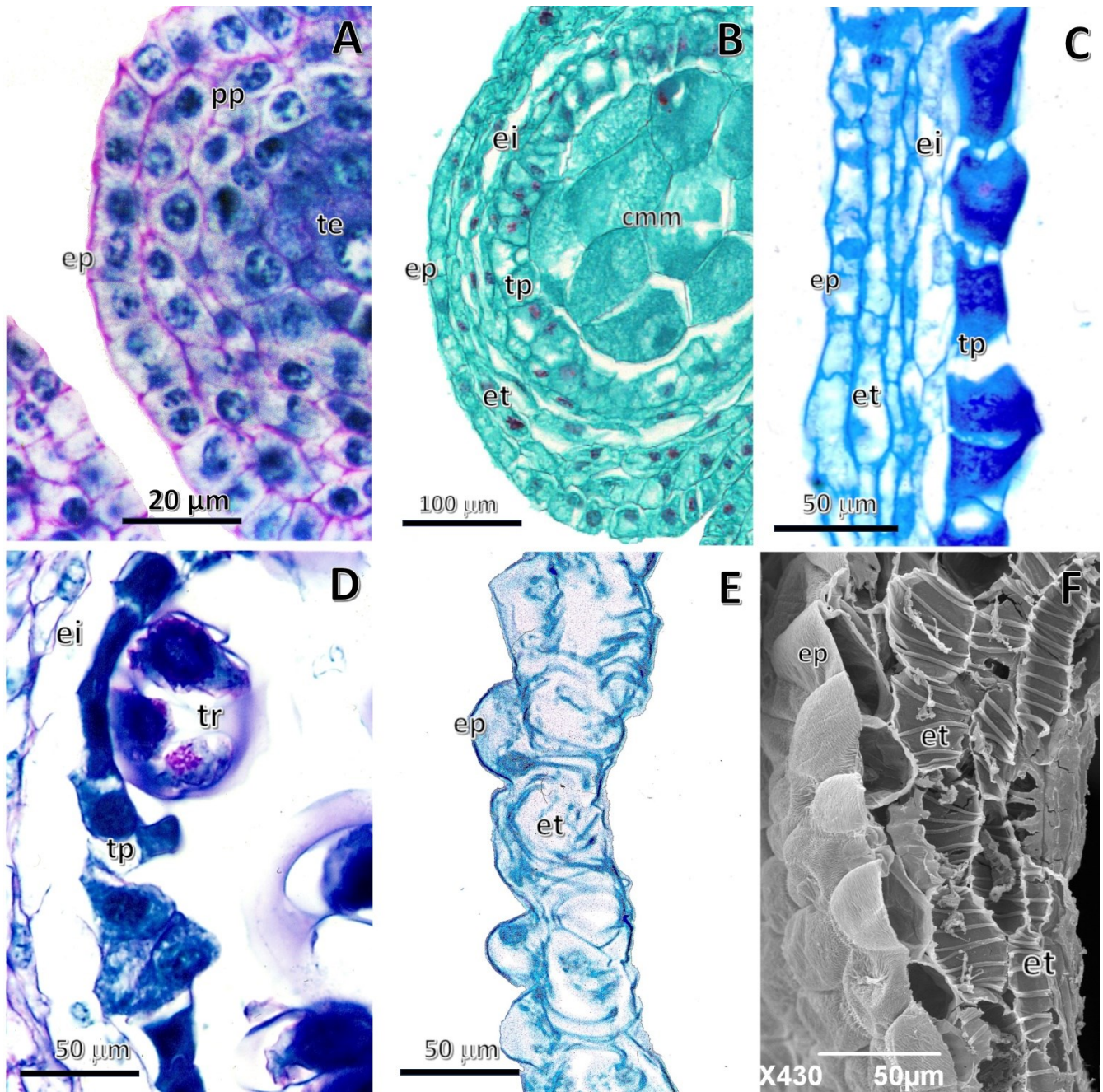


Fig. 4. Desarrollo de la pared de la antera de *T. pavonia*. A, Etapa 0, Tejido esporógeno y células parietales primarias con divisiones periclinales. B, Etapa 1 y 2, diferenciación del endotecio y de los estratos intermedio y del tapete. C, Etapa 3 tapete maduro y colapso parcial de los estratos intermedios. D, Etapa 4 y 5, estratos intermedios vacuolados, tapete con extensiones hacia las tétradas. E, Etapa 6, estratos intermedios y tapete colapsado, inicio del engrosamiento del endotecio. F, Etapa 7, MEB de pared de la antera madura, engrosamiento elicoidales y reticulados, hacia el conectivo con varios estratos. ep, epidermis; ei, estratos intermedios; et, endotecio; pp, células parietales primarias; tp, tapete; tr, tétrada tetraédrica.

ETAPA 5 (21 de julio y 30 de julio). La calosa que rodea a las tétradas se ha degradado totalmente y las microsporas mono-celulares (1n) se separan, la formación del grano de polen joven inicia. Se forma la exina la cual tiñe de azul con ANN, reacción asociada a proteínas. Cerca del se visualizaron numerosos granos de almidón, de color rosados por la tinción de polisacáridos insolubles (APS) (Fig. 2 D). Las células epidérmicas de la pared de la antera se ondulan y alargan en sentido periclinal, excepto las más cercanas a la región del conectivo, el endotecio es vacuolado y los estratos intermedios ya no son claramente distinguibles. Las células del tapete presentan características propias del proceso de muerte celular programada, sus células tienen formas más irregulares que en la etapa anterior y su citoplasma se observa fuertemente teñido de azul con APS-ANN (Fig. 2 F) y de rojo con SVF (Fig. 2 G).

ETAPA 6 (31 de julio y 14 de agosto). Las microsporas forman vacuolas pequeñas que luego coalescen para formar una vacuola central de gran tamaño (Fig. 2. H). Se ha sugerido que la función de estas grandes vacuolas es el establecimiento de la polaridad para el acomodo espacial del núcleo, como ocurre en *Zea mays*, o de microtúbulos y microfilamentos, eventos previos a la mitosis [38] que resultan en la formación de dos células hijas asimétricas, la célula vegetativa y la generatriz. En esta etapa ya no hay granos de polen visibles alrededor del núcleo de las microsporas, fenómeno contrario a lo encontrado en maíz [38]. Los de 6-7 estratos, se reduce a 2 estratos en la región del estomio y se colapsan parcialmente pero aún no se separan (Fig. 3. B). El tapete está totalmente desintegrado, las células epidérmicas son tabloides y el endotecio ha desarrollado engrosamientos lignocelulósicos que también se observan en las células cercanas al conectivo (Fig. 3 D y 4 E). Se ha descubierto que la presencia de lignina en estos engrosamientos es indispensable para que ocurra la dehiscencia de las anteras [39], [40].

ETAPA 7 (15 y 21 de agosto). En las microsporas mono-celulares, ocurre una mitosis asimétrica que caracteriza el inicio de la microgametogénesis. Cada microspora forma una célula vegetativa grande, con núcleo notorio y citoplasma granuloso, y una célula generatriz pequeña con forma de huso, de pared muy delgada y núcleo notorio (Fig. 3 A). Esta división marca el fin del desarrollo de la microspora (1n) y el inicio del desarrollo del grano de polen joven que después de que se forma el tubo polínico a partir de la célula vegetativa (1n), la célula generatriz se volverá a dividir por mitosis (mitosis II) y formará dos células espermáticas, de ploidía 1n cada una. Esta secuencia de desarrollo ha sido descrita por varios autores [6], [41], [42]. En *T. pavonia* tiene lugar una dehiscencia parcial de las anteras uno o dos días antes de la apertura del botón floral debido al colapso y rompimiento de los septos y el estomio (Fig. 3 C). En las anteras de maíz (*Zea mays*), un fenómeno similar fue observado, cuya causa se atribuyó al aumento de CO₂ en la antera por la respiración de los granos de polen [43]. En *Crocus* el estomio se rompe antes de la apertura completa de la flor [36]. En *Z. mays* la dehiscencia sucede por lisis enzimática de los septos, se forma una sola cavidad por teca, y posterior deshidratación del estomio [38], en *T. pavonia* las células del estomio y las células de los septos se rompen en un solo evento de manera sincrónica para la liberación de los granos de polen bicelulares antes de la apertura floral (Fig. 3 C). Además, en la pared de la antera estudiada con MEB, se encontraron estomas pequeñas sin células acompañantes del tipo anomocíticos, algunos cerrados y otros abiertos (Fig. 4.F), (Fig. 4. G). Eames [47] señala que los estomas en las paredes de los esporangios son raros, y dudosamente funcionales. *T. pavonia* tiene una columna estaminal formada por tres estambres con anteras grandes (1.5 cm) aplanadas, basifijas, extrorsas, con dehiscencia longitudinal. Hay una costilla dorsal a cada lado del conectivo (Fig. 3 C).

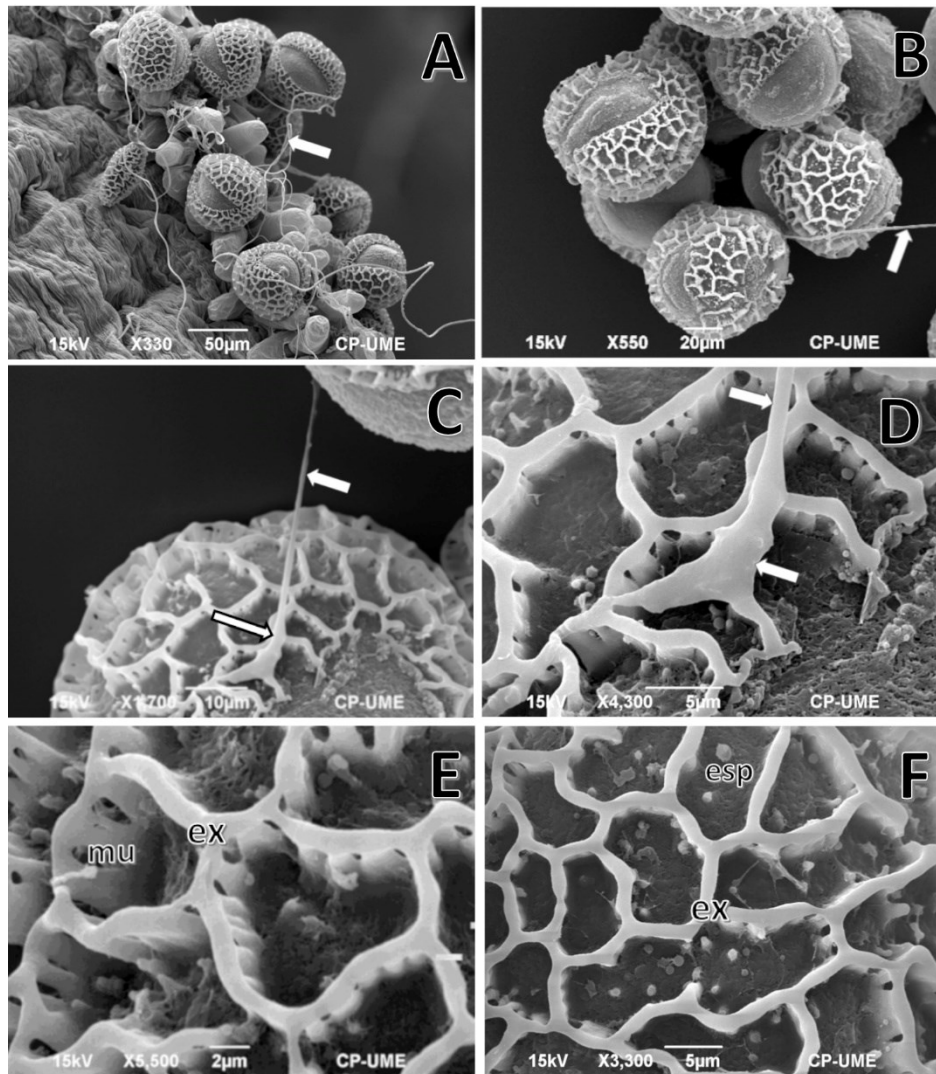


Fig. 5. Estructura del polen maduro con MEB (Etapa 7). A, granos de polen con hilos de viscina. B, granos de polen monocarpados con hilo de viscina. C, grano de polen con un hilo de viscina emergiendo de la exina. D, detalle de la emergencia del hilo de viscina de la exina. E, ornamentación de la exina que muestra muros discontinuos. F, exina con espículas basales en forma de gránulos. esp, espículas; ex, exina; mu, muri. Flechas blancas indican los hilos de viscina.

Las células de la epidermis de estas costillas desarrollan paredes anticlinales muy elevadas (Fig. 4 E y F). El endotecio monoestratificado, con engrosamientos retículo-helicoidales y lignocelulósicos (Fig. 3. C), forma 3-4 estratos cerca del conectivo aquí también se observaron células grandes con taninos (Fig. 3. D), (Fig. 4. D). Estos engrosamientos se asocian con resistencia a tensiones durante la expansión celular en anteras grandes, con granos de polen grandes [48]. Por su posición, es muy probable que esta región también contribuya a la apertura de la antera. Los granos de almidón, como materia de

reserva energética, tienen una función importante en el desarrollo de óvulos y polen de *Prunus persica* [49]. Así en *T. pavonia* los granos de almidón se presentaron durante el desarrollo de la antera y su abundancia estuvo concentrada en el tejido conectivo y en la epidermis de los lóculos. Se han propuesto varias rutas metabólicas para estos granos de almidón: división de plastidios, translocación de carbohidratos para desarrollo de la antera, y microsporas [50]. Los granos de polen son bisulcados con membrana de la apertura o intina psilada, exhiben pared con exina intactada reticulada, heterobrocada y

curvimurada. Los pili (báculas) fusionados forman columnas de diferente grosor y las espículas o gránulos están dispuestos en la base del lumen o nexina, son bisulcados con membrana de la abertura o intina psilada (Fig. 5 E y F). La condición bisulcada es característica de la subtribu Tigridiinae y se interpreta como un carácter derivado (sinapomorfia) ya que el polen monosulcado es el tipo más común, y se considera ancestral para las monocotiledóneas y en general para angiospermas [44]. En *T. pavonia* se encontró que son muy grandes (72.2-89.0 (-104.2) μm X (59.4-) 69.4 (-77.3) μm , comparados con el resto de las especies del mismo género, pueden ser elípticos o esferoidales en vista polar, y monosulcados o bisulcados [16]. En 1970, Molseed [45] detectó presencia de hilos de viscina en granos de polen de *T. pavonia* pero no documentó su hallazgo, en contraste Rudall y Wheeler [16] no observó esta estructura en material herborizado, posiblemente por estar seco. Nuestras observaciones con MEB en granos de polen obtenidos de plantas frescas de *T. pavonia*, evidenciaron la presencia de hilos tipo viscina, que emergen de la exina (Fig. 5. B y C). Con MEB pudo documentarse un detalle del origen del hilo de viscina desde una columna de la exina (Fig. 5 D), que de acuerdo con la literatura se sugiere que estos son de esporopolenina [46]. La presencia de polenkit, fue corroborada por la presencia de gotas lipídicas en el aplastado de granos de polen fresco, en una gota de agua. Estas dos estructuras (hilos de viscina y polenkit) del grano de polen de *T. pavonia* aseguran la permanencia de los granos de polen sobre el estigma (Fig. 5 A) y adherencia al cuerpo de polinizadores.

CONCLUSIONES

El desarrollo temprano del grano de polen de *T. pavonia*, desde las células madre de microsporas hasta la formación de las tétradas de microsporas, sucede dentro del bulbo subterráneo. En esta especie se forman dos tipos de tétradas, tetraédricas e isobilaterales por citocinesis sucesiva. El tapete es del tipo secretor con extensiones hacia las tétradas por lo que se le podría considerar un tipo

intermedio entre secretor-ameboide. Los engrosamientos del endotecio son lignocelulósicos helicoidales que en algunas regiones se anastomosan por lo que podrían denominarse retículo-helicoidales. La dehiscencia parcial de la antera sucede antes de apertura total de la flor. En *T. pavonia* ocurre colapso y degradación de los septos y del estomio de manera sincrónica. El estudio con MEB documenta por primera vez que los hilos de viscina, se originan de la exina en el género *Tigridia* y familia Iridaceae. En estudios estructurales de biología reproductiva de plantas, la ML y MEB son herramientas esenciales y complementarias. Este trabajo es una contribución original que aporta información nueva sobre las estructuras reproductivas masculinas, para la tribu Tigridieae y *T. pavonia*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONAHCYT por la beca de doctorado de la primera autora y a Simón Morales Rodríguez, por la asistencia técnica en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados. Agradecemos los comentarios de Iris Grisel Galván Escobedo respecto al grano de polen y a los revisores por las observaciones que contribuyeron a mejorar el presente estudio.

REFERENCIAS

- [1] Calderón R.G., y Rzedowsky J. (1990) "Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. III" Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán, 325-339 pp.
- [2] Vázquez-García L.M., Przybyla A.A., de la Cruz Torres E., Navarro H., Torres Rodríguez G. (2001) "Morphological description of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.F.) Ker. Gawl." *Journal of Applied Botany* 75 (1-2): 14-19
- [3] Goldblatt P., Rodríguez A., Powell M. P., Davies T. J., Manning J. C., van der Bank M., Savolainen V. (2008) "Iridaceae 'Out of Australasia'? phylogeny,

- biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences” *Systematic Botany* 33(3): 495-508
- [4] Munguía-Lino G., Vargas-Amado G., Vázquez-García, L.M., Rodríguez, A. (2015) “Riqueza y distribución geográfica de la tribu Tigridieae” *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 80-98
- [5] Davis, G.L. (1966) “Systematic embryology of angiosperms” New York, Wiley, 528 p.
- [6] Astrand J., Knight C., Robson, J., Talle, B., Wilson, Z.A. (2021) “Evolution and diversity of the angiosperm anther: trends in function and development” *Plant Reproduction* 34:307–319 <https://doi.org/10.1007/s00497-021-00416-1>
- [7] Nadot S., Forchioni, A., Penet, L. Dreyer L.D., Forchioni, A., Ressayre A. (2006) “Aperture pattern and microsporogenesis in Asparagales” *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic* 22 (1):1197-203
- [8] Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. y Srivastava, P.S. (1992) “Comparative embryology of angiosperms”. Vol II. New York, USA: Springer-Verlag. 885-886 pp
- [9] Chichiriccó, G. (1989) “Embryology of *Crocus thomasii* (Iridaceae)” *Plant Systematics and Evolution* 168: 39-47
- [10] Zhang, D., Wang, L., Zhuo L. (2011) “Embryology of *Iris mandshurica* Maxim. (Iridaceae) and its systematic relationships” *Plant Systematics and Evolution* 293:43–52
- [11] Fan L., Hasenstein K. H., Wang L. (2019) “Embryology of *Iris sanguinea* Donn ex Horn. and its systematic relationship” *Journal of Forestry Research* 30 (6):2007–2020
- [12] Gupta, S.C., Nanda, K. (1973) “Fibrous endothecium, tapetum, and pollen development in *Belamcanda chinensis* DC” *Botanical Gazette* 134 (2):125-129
- [13] Lakshmanan K.K., Philip V.J. (1971) A contribution to the embryology of Iridaceae. *Proceedings of Indian Academy of Sciences Botanical Sciences* 73: 110-116
- [14] Penet, L., Nadot S., Ressayre, A., Forchioni, A., Dreyer, L., Gouyon, P.H. (2005) “Multiple developmental pathways leading to a single morph: monosulcate pollen (examples from the Asparagales)” *Annals of Botany (Oxford)* 95:331-343. doi:10.1093/aob/mci030
- [15] Penet, L., Laurin, M., Gouyon, P.H., Nadot, S. (2007) “Constraints and selection: insights from microsporogenesis in Asparagales” *Evolution and development* 9:460-471. doi:10.1111/j.1525-142X.2007.00183.x
- [16] Rudall, P., Wheeler, A. (1988) “Pollen morphology in Tigridieae (Iridaceae)” *Kew Bulletin* 43 (4): 693-701
- [17] Shivana, K.R. (2003) “Pollen biology and biotechnology” *Science Publishers, India*. 26-44 pp
- [18] Manning J.C. y Goldblatt P. (1990) “Endothecium in Iridaceae and its systematic implications” *American Journal of Botany* 77(4): 527-532
- [19] Goldblatt P. (1990) “Phylogeny and classification of Iridaceae” *Annals of the Missouri Botanical Garden* 77: 607-627
- [20] Cuevas-García, E. (2009) “La esterilidad masculina en plantas, una perspectiva” *Biológicas* 11: 79-86
- [21] Fernández-Gómez, J., Talle, B., Wilson, Z.A. (2015) “Anther and pollen development: A conserved developmental pathway” *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 876-891
- [22] Fernández-Gómez, J., Talle, B., Wilson, Z.A. (2020) “Increased expression of the MALE STERILITY1 transcription factor gene results in temperature-sensitive male sterility in barley” *Journal of*

Experimental Botany 71 (20):6328-6339
doi:10.1093/jxb/eraa382

- [23] Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) México.
<https://smn.conagua.gob.mx/tools/RESOURCES/Normales5110/NORMAL15101.TXT>
- [24] Ruzin, S. E. (1999) "Plant Microtechnique and microscopy" New York, Oxford University Press, 334 p.
- [25] Sass, J.E. (1958) "Botanical microtechnique" 3a. Ed. Iowa State University Press, Iowa, 228 p.
- [26] Johansen, D.A. (1940) "Plant microtechnique" New York, McGraw-Hill, 553 p
- [27] Fisher, D.B. (1968) "Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy" *Histochemie* 16: 92-96
- [28] Pacini, E., Hesse, H. (2005) "Pollenkitt- its composition, forms and functions" *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 200 (5, 6):399-415
- [29] Kelliher, T., Egger, R.L., Zhang, H., Walbot, V. (2014) "Unresolved issues in pre-meiotic anther development" *Frontiers in Plant Science* 5: 1-9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00347>
- [30] Rudall, P.J., Owens S. J., Kenton A. Y. (1984) "Embryology and breeding systems in *Crocus Iridaceae*-a study in causes of chromosome variation" *Plant Systematics and Evolution* 148: 119-134
- [31] Raymúndez, U.M., Escala, J.M., Enrech, N.X. (2008) "Microsporogénesis en *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. (Amaryllidaceae)" *Acta Botanica Venezuelica* 31 (2): 409-424
- [32] Gori P. (1982) "Accumulation of polysaccharides in the anther cavity of *Allium sativum*, clone Piemonte" *Journal of Ultrastructure Research* 81 (2): 158-162
- Acta Microscopia, Vol. 32, No 2, 2023, pp 16-28*
- [33] De Storme, N. y Geelen D. (2013) "Cytokinesis in plant male meiosis" *Plant Signaling & Behavior* 8 (3): <http://dx.doi.org/10.4161/psb.23394>.
- [34] Skvarla, J.J., y Larson, D.A. (1963) "Nature of cohesion within pollen tetrads of *Typha latifolia*" *Science* 140: 173- 175
- [35] Chichiricco, G. (1989) "Microsporogenesis and pollen development in *Crocus sativus* L." *Caryologia*: 42 (3-4): 249-257
- [36] Furness, C.A. y Rudall, P.J. (1998). "The tapetum and systematics in monocotyledons" *The Botanical Review* 64 (3): 201-239
- [37] Shamrov, I.I., Anisimova, G.M. y Babro A.A. (2021) "Tapetum types and forms in angiosperms" *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section Botany* 75 (3):167-179 DOI: 10.2478/prolas-2021-0026
- [38] Bedinger, P. (1992) "The Remarkable Biology of Pollen" *The Plant Cell* 4: 879-887
- [39] Wilson, Z.A., Song, J., Taylor, B. y Yang, C. (2011) "The final split: the regulation of anther dehiscence" *Journal of Experimental Botany* 62 (5): 1633-1649
- [40] Hao, Z., Avci, U., Tan, L., Zhu, X., Glushka, J., Sivakumar Pattathil, S., Eberhard, S., Sholes, T., Rothstein, G.E., Lukowitz, W., Orlando, R., Hahn, M.G., Mohnen, D. (2014) "Loss of *Arabidopsis* GAUT12/IRX8 causes anther indehiscence and leads to reduced G lignin associated with altered matrix polysaccharide deposition" *Frontiers in Plant Science* 5: 1-21
- [41] Berger, F., Twell D. 2011 "Germline specification and function in plants" *Annual Review of Plant Biology* 62: 461-484
- [42] Hafidh, S., Fila, H., Honys, D. (2016) "Male gametophyte development and function in

angiosperms : a general concept“ *Plant Reproduction*
29:31-51 DOI 10.1007/s00497-015-0272-4

[43] Keijzer C.J., Leferink-Ten Klooster, H.B, Reinders M.C. (1996) “The mechanics of the grass flower: anther dehiscence and pollen shedding in maize” *Annals of Botany* 78: 15–21

[44] Goldblatt, P., Le Thomas, A. (1992) “Pollen apertures, exine sculpturing and phylogeny in Iridaceae subfamily Iridoideae” *Palaeobotany and Palynology* 75 (3–4): 301-315
[https://doi.org/10.1016/0034-6667\(92\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0034-6667(92)90022-9)

[45] Molseed, E. (1970). “The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America” *University of California Publications in Botany* 54: 12-18

[46] Hesse, M. (1981) “Pollenkitt and viscin threads: their role in cementing pollen grains” *Grana* 20: 145-152

[47] Eames, A.J. (1961) “The morphology of angiosperms”
<https://archive.org/details/morphologyofangi00eame>

[48] Keijzer, C.J. (1987) “The processes of anther dehiscence and pollen dispersal in the formation and the transfer mechanism of pollenkitt, cell-wall development of the loculus tissues and a function of orbicules in pollen dispersal” *New Phytologist* 105: 499-507

[49] Santiago-Mejía, H., Zavaleta-Mancera, H.A., Cortés-Flores J.I., Turrent-Fernández, A., Albino-Garduño, R. (2018) Vascularization and starch grains during the morphogenesis of peach floral buds on different flowering date *Agrociencia* 52: 1121-1135

[50] Pacini E. (2000) “From anther and pollen ripening to pollen presentation” *Plant Systematics and Evolution* 222: 19-43