

DESARROLLO MORFOLÓGICO DE LA ANTERA Y EL GRANO DE POLEN DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

Juan Carlos Herrera-Pinilla *

RESUMEN

HERRERA P., J.C. Desarrollo morfológico de la antera y el grano de polen de *Coffea arabica* L. var Colombia. Cenicafé (Colombia) 46 (1): 21-31 1995.

Se hizo un seguimiento del desarrollo *in vivo* del polen y la antera de *Coffea arabica* L. var Colombia desde los primeros estados de diferenciación del botón floral, hasta el momento de la dehiscencia. El estudio histológico mostró la forma como se diferencian los tejidos somáticos de la antera, así como el tejido esporógeno que conduce al desarrollo del polen maduro. Mediante la utilización de un colorante de fluorescencia ADN específico (Mitramicina) fue posible visualizar claramente el proceso de microesporogénesis, de importancia en el desarrollo de nuevas tecnologías para el mejoramiento de plantas. Las observaciones realizadas permitieron comprobar la estrecha relación entre el desarrollo de la antera y la formación del grano de polen en plantas de café.

Palabras claves : Morfología del café, botánica, diferenciación, mejoramiento genético, crecimiento y desarrollo, histología, microesporogénesis.

ABSTRACT

An *in vivo* study was carried out to follow development of pollen and anthers of *Coffea arabica* L. var Colombia from the first stages of differentiation of the flower bud until dehiscence. The histological study showed the form of differentiation of the somatic tissues of the anther and the sporogenic tissue that leads to development of the mature pollen. By means of a fluorescent DNA-specific dye (Mitramicina) it was possible to clearly visualize the process of microsporogenesis, of importance in the development of new technologies for plant breeding. The observations carried out proved the close relationship between the development of the anther and the formation of the pollen grain in the coffee plant.

Keywords: Coffee, morphology, botanic, differentiation, breeding, grow and development, histology, microsporogenesis

* Asistente de Investigación. Mejoramiento Genético, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia

El polen en sus diferentes estados de desarrollo desde la microspora hasta su germinación, representa un elemento muy útil para el estudio de la genética molecular, la expresión de genes y el desarrollo celular del gametofito masculino en las plantas superiores (22). En el caso del cafeto, el estudio del desarrollo del polen resulta de gran importancia para el aprovechamiento de nuevas tecnologías enfocadas al mejoramiento genético del cultivo, tales como la fertilización *in vitro*, la variación gametoclinal, la androgénesis y la transformación genética.

Son escasos los trabajos relacionados con el desarrollo gametofítico en café, y salvo algunas observaciones bioquímicas (19, 20) y citológicas (12, 13, 14, 15), no existen estudios recientes al respecto; por tanto, el presente estudio aporta nuevos conocimientos acerca de la biología reproductiva del café, con énfasis en el desarrollo histológico de la antera de *Coffea arabica* L. y su relación con las diferentes fases de desarrollo del grano de polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Observaciones histológicas. El desarrollo de la antera se estudió en botones florales de *C. arabica* L. var. Colombia de diferentes tamaños (5 a 20 mm). Las anteras una vez disecadas se fijaron por espacio de dos horas en una solución compuesta por glutaraldehído (1%), formaldehído (4%) y buffer Millonig (Na_2HPO_4 , 2.0 %; NaOH, 2.52 %; Glucosa, 5.4 %) en proporción 1:1:1 respectivamente. Antes y después de la pos-fijación de las anteras en tetróxido de osmio (1 %), se realizaron tres lavados con una solución buffer de cacodilato (0.2 M). Luego de la deshidratación de los tejidos y utilizando una serie de soluciones diluidas de etanol (25, 50, 75, 90 y 100 %), las muestras se embebieron en resina spurr y se incubaron a 65 °C por 24 horas (16).

Con ayuda del ultramicrotomo, se obtuvieron cortes semifinos de 0,5 y 1,0 μm de espesor, que se tiñeron con azul de toluidina y posteriormente se tomaron fotografías en el microscopio de campo claro.

Observaciones citológicas. Para el seguimiento del desarrollo *in vivo* del grano de polen, se realizaron observaciones mediante microscopía de transluz y de epifluorescencia.

Para las observaciones bajo el microscopio de luz transmitida, se tomaron 70 botones florales de *Coffea arabica* L. var. Colombia con una longitud entre los 5 y los 20 mm y se fijaron en una solución de Carnoy compuesta de etanol y ácido acético en proporción 3:1 durante 24 horas; posteriormente se tomaron tres anteras por botón para extraer las microsporas contenidas en su interior, por presión sobre una lámina porta-objetos. Luego de retirar el material de la pared de la antera, se adicionaron unas gotas de acetocarmín, calentando suavemente la lámina durante algunos segundos para permitir la mejor fijación del colorante sobre las estructuras celulares.

Las observaciones de fluorescencia requirieron de aislamiento mecánico de las microsporas; se presionaron las anteras sobre una malla con poro de 350 μm , y se lavaron luego con medio de aislamiento compuesto por las sales básicas de Murashige y Skoog (17) diluidas a la mitad, HCl-cisteína (0,3 g/L), manitol (55 g/L) y un pH ajustado a 5,8.

Se utilizó la metodología propuesta por Pace *et al.* (18), para lo cual, se tomó un volumen de 35 μl de la suspensión de microsporas y se mezcló con unas gotas de solución buffer chopping *. Posteriormente se adicionaron 5 μl de mitramicina (0,5 mg/ml), un colorante de fluorescencia afín con el DNA

* ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 45 mM; Citrato trisódico, 30 mM; MOPS, 20 mM; Triton x-100, 1mg/ml y pH = 7,0)

nuclear y de amplia utilización en estudios de micro-esporogénesis (2). Al cabo de 20 min, las muestras se observaron bajo un microscopio Zeiss Axiophot dotado con un equipo de epifluorescencia y un juego de filtros de excitación en el margen de transmisión de 450 y 490 nm.

En todas las muestras se observó y registró la frecuencia y tipo de microsporas presentes, y se caracterizaron las diferentes fases de desarrollo del grano de polen (Tabla 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de la antera. En los cortes transversales de botones de 4 a 5 mm de longitud (Figura 1a) se observa que los tejidos tanto de la antera como del ovario ya están bien diferenciados y que los pétalos muestran un arreglo circular que encierra totalmente los órganos florales en desarrollo. Durante este estado, las

anteras ya presentan una diferenciación completa del arquesporio que dará finalmente origen tanto a las células del tapete como a los granos de polen.

En la Figura 1b se observan las células arquesporiales situadas hacia los extremos laterales de la antera inmadura. Estas células, que tiñen más denso, se disponen en dos capas bien definidas: una capa externa de células primarias del tapete y una capa interna de células madres del grano de polen.

Cuando el botón floral tiene entre 8 y 10 mm de longitud, se han formado totalmente los cuatro lóculos de la antera (Figura 1c). En este estado es fácil distinguir una capa epidérmica unicelular, así como un tejido conectivo denso y un haz vascular que penetra a través del filamento y recorre el tejido central de la antera (3). Dentro de cada lóculo es posible observar una capa de células que forman el tapete y que

TABLA 1. Caracterización de los diferentes estados de desarrollo del grano de polen en *C. arabica* L. var. Colombia.

TIPO DE CÉLULA	DESCRIPCIÓN	
CÉLULA MADRE	Célula en fase premeiótica presente en botones de 5 mm de longitud.	
TETRADA	Célula madre una vez se han formado las cuatro células producto de la división meiótica.	
MICROSPORA UNINUCLEADA TEMPRANA	Microspora recién liberada de la tétrada.	
MICROSPORA UNINUCLEADA TARDÍA	Microspora en fase premitótica.	
MICROSPORA BINUCLEADA	Microspora con dos núcleos producto de la primera división mitótica (división asimétrica).	

recubren las cavidades internas. Estas células se hallan en plena actividad y su función principal consiste en secretar una serie de sustan-

cias implicadas en la nutrición y formación del grano de polen (1,5). Al igual que lo observado en otras especies del género *Coffea* (19, 20), en *C. arabica* el tapete es de tipo secretorio y degenera progresivamente hasta desaparecer justo al momento de la dehiscencia de la antera.

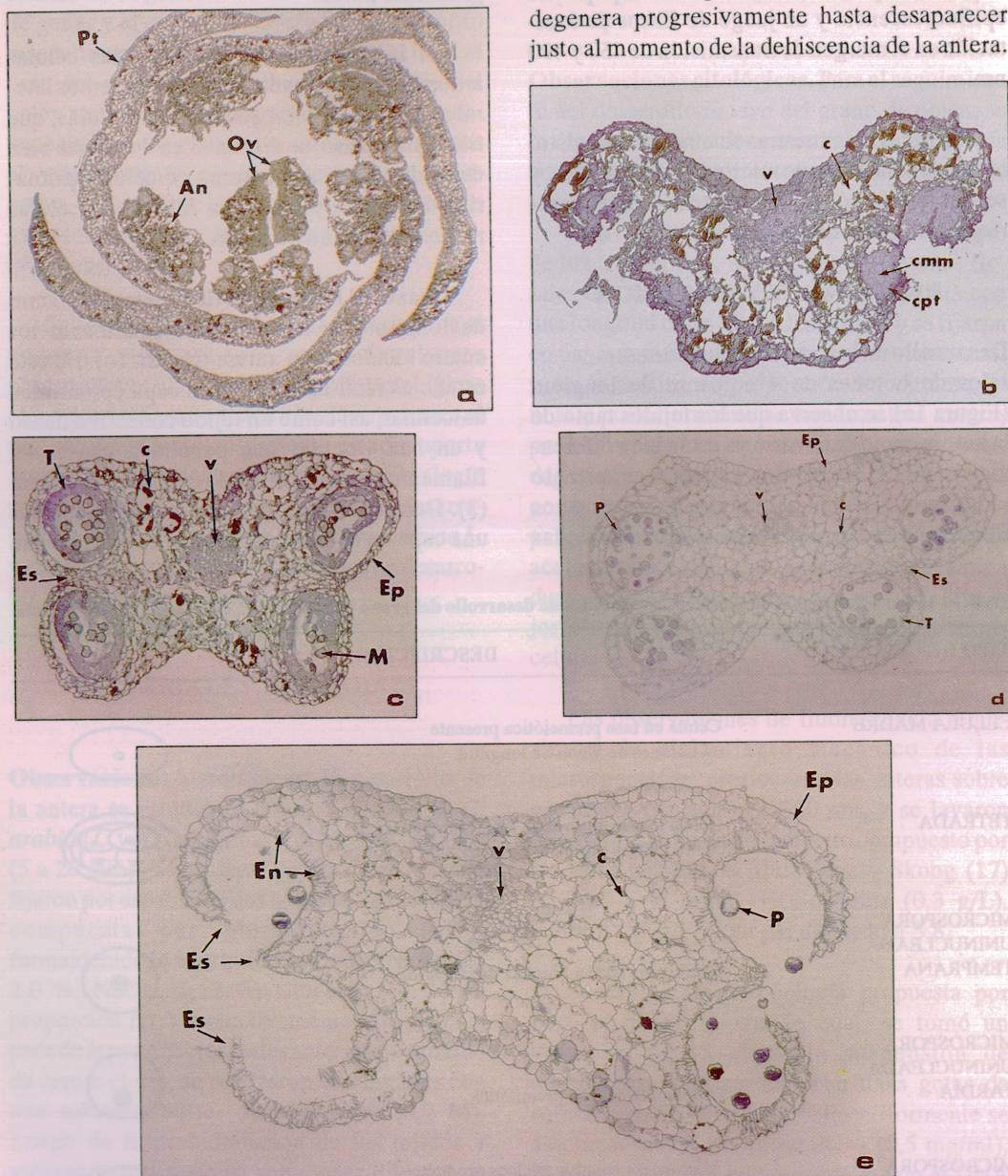


Figura 1. Diferentes estados de desarrollo de la antera de *Coffea arabica* L. Var. Colombia en botones de 4 - 5 mm (a y b) 8 - 10 mm (c) y 15 mm (d y e). T, tapete; v, tejido vascular; c tejido conectivo; M, microsporas; P, polen; Pt, pétalo; An, antera; Ov, ovario; Es, estomio; Ep, epidermis; En, endotecio; cmm, célula madre de la microspora; cpt, célula primaria del tapete. (Aumento = 100x).

Tres a cinco días antes de la antesis (botones de 15 mm de longitud) las células que forman el estomio o zona de apertura de la antera, muestran una estructura de paredes celulares delgadas que se rompen fácilmente al momento de la dehiscencia (Figura 1d), mientras que las células del tapete se pierden por completo.

Cuando se produce la dehiscencia de las anteras (Figura 1e) los botones han alcanzado una longitud promedio de 20 mm. En este estado, se observan claramente los engrosamientos característicos de las células subepidérmicas que forman la capa fibrosa o endotecio (Figuras 2 y 3).

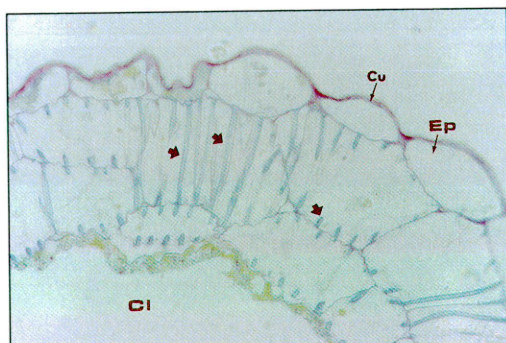


Figura 2. Células del endotecio mostrando los engrosamientos característicos de la pared celular (flechas). Cl, cavidad locular; Cu, cutícula; Ep, epidermis. (Aumento = 1000x).

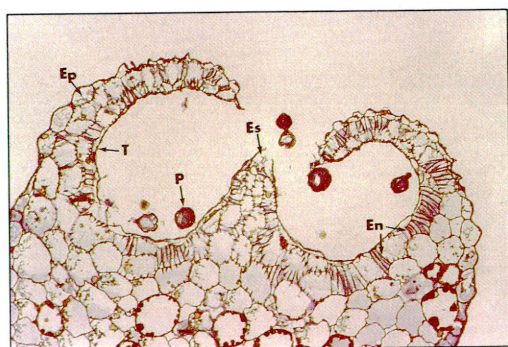


Figura 3. Antera madura de *Coffea arabica* L. var. Colombia, mostrando el detalle de un saco polínico en el momento de la dehiscencia de la antera. T, tapete; P, polen; Es, estomio; Ep, epidermis; En, endotecio. (Aumento = 400x).

Estas estructuras provocan que las células cambien su forma en condiciones de deshidratación (épocas secas), haciendo que todo el tejido epidérmico se contraiga produciéndose la apertura de los sacos polínicos por rompimiento del tejido a lo largo de la zona más delgada denominada estomio (5,7).

El análisis histológico mostró que tanto las células que dan origen al tapete como al grano de polen (Figura 4), se hallan muy compactas durante las primeras etapas del desarrollo y luego empiezan a diferenciarse en forma progresiva, hasta llegar a formar los tejidos antes descritos.

Por otra parte, fue posible advertir la presencia de algunos estomas sobre la epidermis que rodea la antera (Figura 5). Tales estructuras no son muy frecuentes en este tipo de tejidos, sin embargo, se han registrado cubriendo el filamento de la antera en otras especies vegetales (4).

Desarrollo del grano de polen. El proceso de microesporogénesis en *Coffea arabica* L. se ha reportado como normal, pues presenta todas las características propias del desarrollo gametofítico de las angiospermas (3, 14).

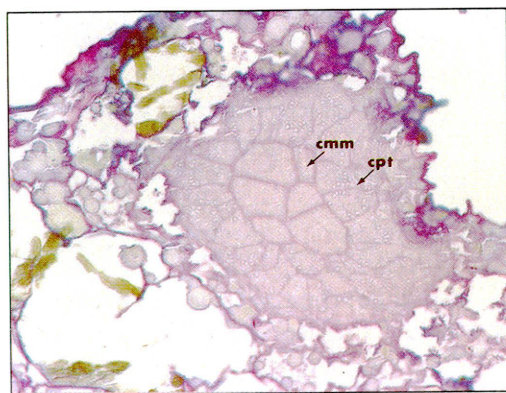


Figura 4. Células esporógenas primarias derivadas del tejido arqueesporial. cmm, célula madre de la microspora; cpt, célula primaria del tapete. (Aumento = 400x).

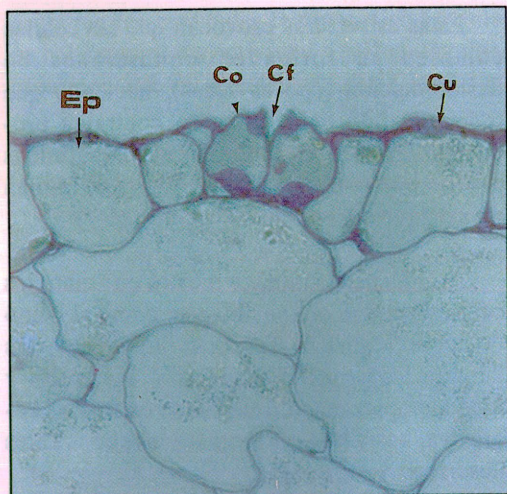


Figura 5. Estoma en la epidermis del tejido de la antera. Ep, célula de la epidermis; Co, célula oclusiva; Cf, cavidad estomática frontal; Cu, cutícula. (Aumento = 1000x).

Las células madres del polen (Figura 6a) inician su diferenciación con la formación de una gruesa capa callosa que se distingue claramente al microscopio de transluz. Durante esta fase, se inicia el proceso de división meiótica con la formación de dos núcleos haploides (meiosis I) -Figura 6b- seguida por una división mitótica de estos (meiosis II) para formar finalmente cuatro núcleos haploides bien diferenciados (Figura 6c).

A continuación, se produce la segmentación del citoplasma (citocinesis) que origina la tétrada (Figuras 7a, 7b y 8a); las microsporas recién formadas se liberan gracias a la ruptura de la pared de callosa (Figuras 7c y 8b) e inician la formación de una pared compuesta por dos capas bien definidas: la exina y la intina, características de la microspora uninucleada madura (Figuras 7d y 8c).

El paso de la fase uninucleada a binucleada, supone una división asimétrica del núcleo la cual se visualizó claramente gracias a la técnica de epifluorescencia (Figuras 8d, 8e, y 8f), pero con dificultad cuando se tiñeron las células con acetocarmín (Figura 7e). Esta divi-

sión mitótica que sufre la microspora origina un núcleo vegetativo grande y muy denso, y un núcleo generativo más pequeño y difuso, los cuales caracterizan al grano de polen maduro.

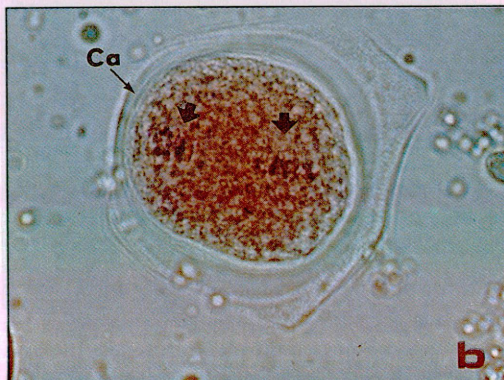


Figura 6. Estados iniciales de diferenciación de las células madre del polen del café. (a) Células madres del polen; (b) y (c) formación de 2 y 4 núcleos haploides respectivamente (flechas), como producto de la meiosis. (a, pared de callosa). Aumento 630x.

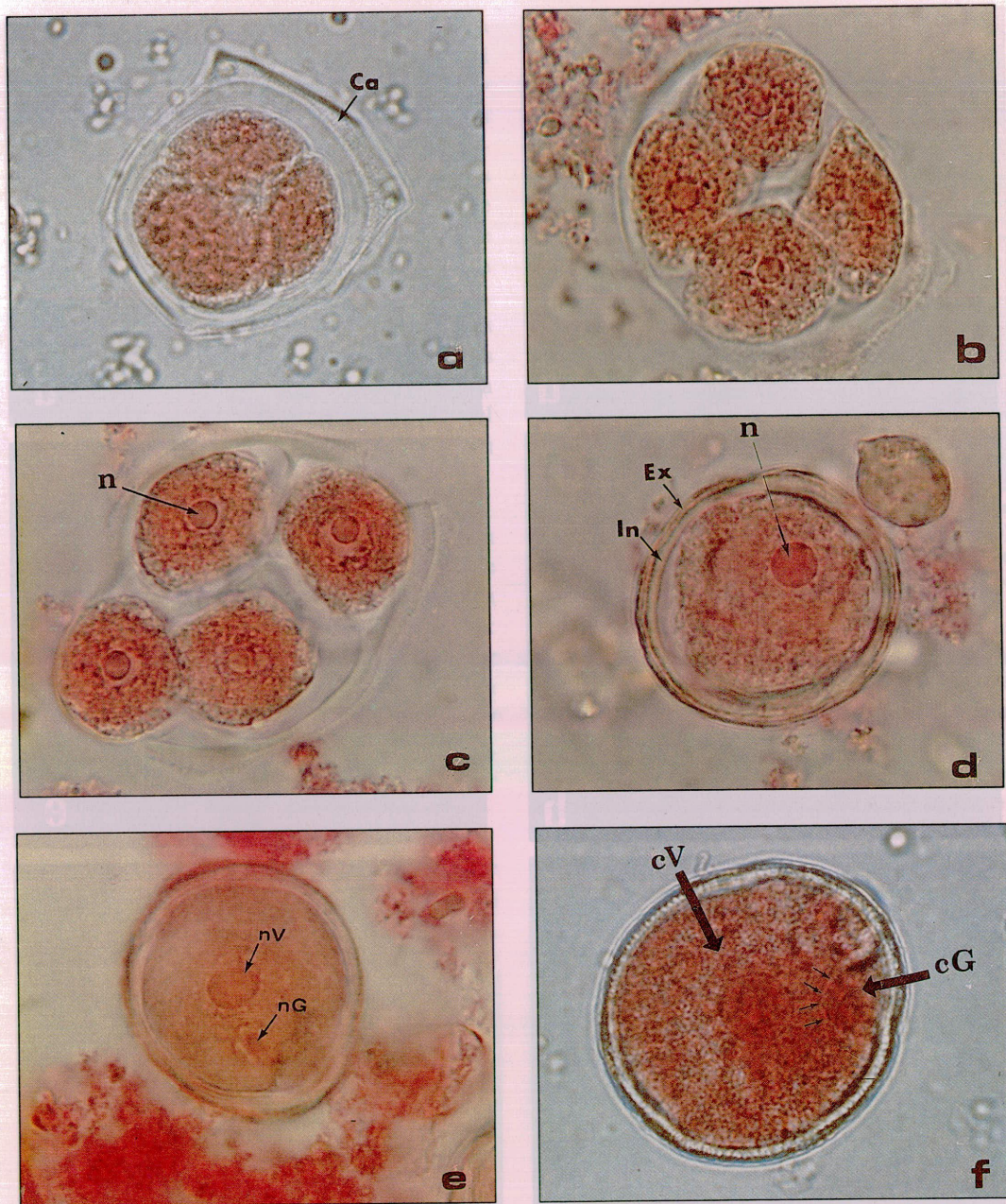


Figura 7. Secuencia del desarrollo del grano de polen de café desde el estado de tétrada hasta la formación del polen binucleado. Microfotografías de campo claro utilizando tinción con acetocarmin para destacar algunas estructuras celulares. (a) tétrada recién formada; (b) tétrada madura; (c) liberación de las microsporas recién formadas, por rompimiento de la pared de callosa; (d) Microspora uninucleada temprana; (e) Microspora binucleada temprana; (f) microspora binucleada madura;. Ca, pared de callosa; n, núcleo; Ex, exina; In, intina; nV, núcleo vegetativo; nG, núcleo generativo; cV, célula vegetativa; cG, célula generativa. (Figuras (a) a (c), aumento = 630x; Figuras (d) a (f), aumento = 1000x).

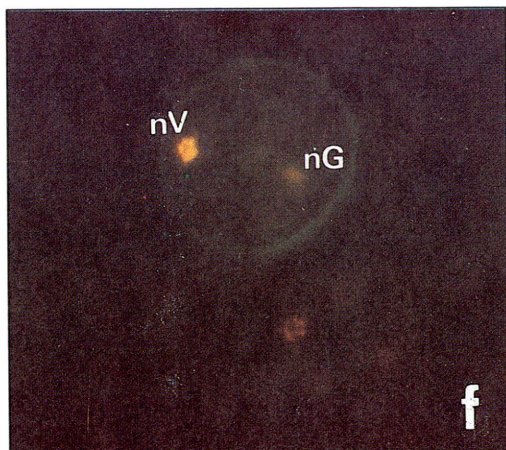
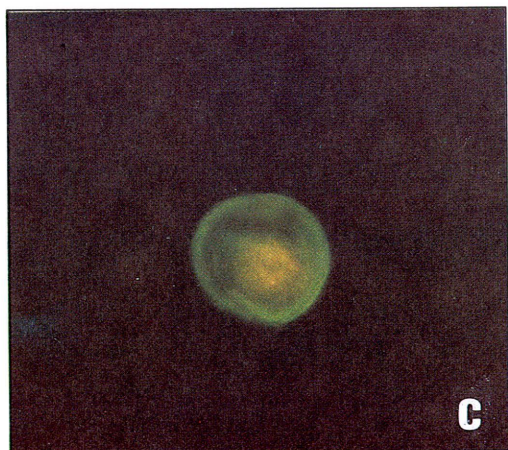
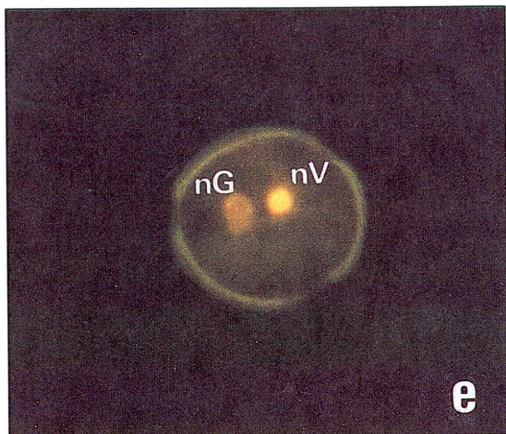
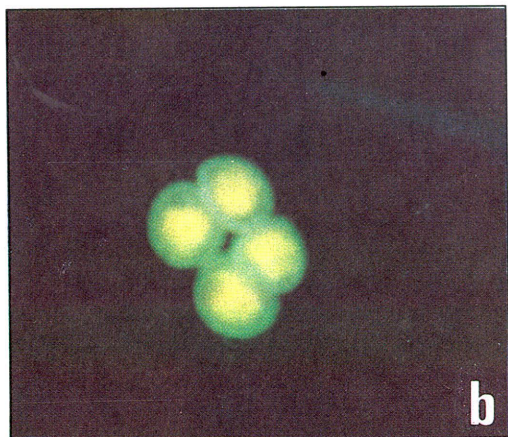
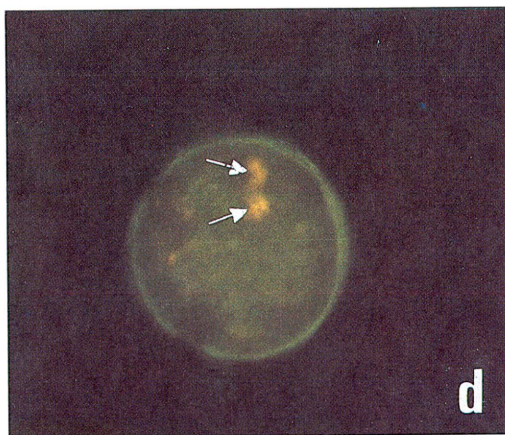
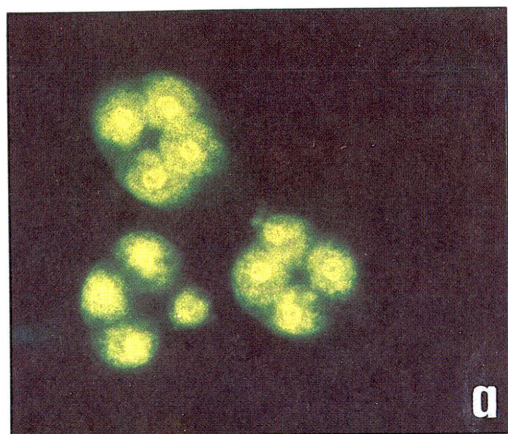


Figura 8. Microfotografías de fluorescencia de los diferentes estados de desarrollo del polen de café. Se tiñó con mitramicina para destacar las diferentes fases de división del núcleo. (a), tétradas tempranas, (b), tétrada madura; (c), microspora uninucleada; (d), microspora binucleada temprana; (e), microspora binucleada madura; (f), microspora binucleada tardía. nV, núcleo vegetativo; nG, núcleo generativo. Aumento = 400x.

el estado binucleado, la microspora inicia una acumulación de almidón que hace muy difícil distinguir su estructura interna durante las etapas siguientes (Figura 7f); este hecho ya había sido mencionado por Medina (12) y posteriormente por otros investigadores, durante las primeras observaciones del proceso de microesporogénesis en *C. arabica* L.. En este estudio, sin embargo, la tinción con mitramicina permitió observar claramente todo el proceso. La formación de vacuolas con acumulaciones de almidón (Figura 9), le permite a las microsporas adquirir una autonomía metabólica que es característica de las últimas etapas del desarrollo gametofítico, y que garantiza su madurez total (19).

Para completar la maduración de la microspora, se forma una membrana que divide el citoplasma de la microspora binucleada. Esta división origina dos células bien diferenciadas: una célula llamada vegetativa, conformada por cerca del 85 % del citoplasma, y otra célula (célula generativa) cuyo volumen es menor y presenta una forma lenticular característica (14). En la Figura 10 se observa claramente la estructura del grano de polen bicelular.

Durante los días previos a la dehiscencia de la flor ya es posible encontrar granos de polen bicelulares los cuales, en algunas ocasiones,

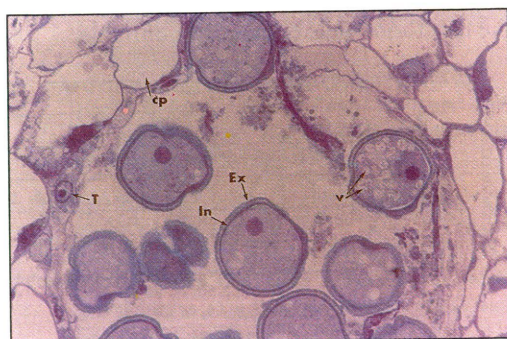


Figura 9. Microsporas de café dentro del saco de la antera, tres días antes de la antesis. In, intina; Ex, exina; v, vacuola; cp, células del parenquima; T, célula del tapete. (Aumento = 1000x).

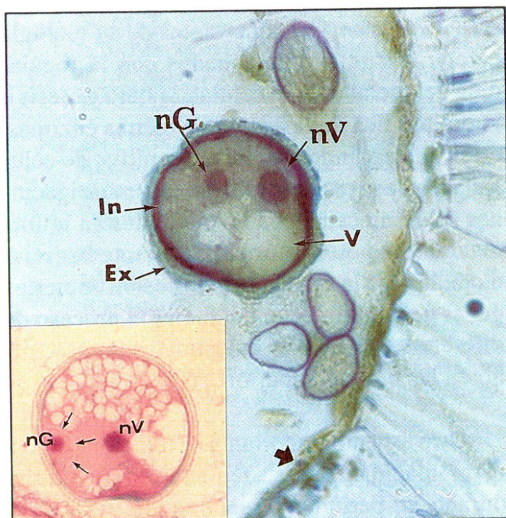


Figura 10. Microspora binucleada justo antes de la apertura de la antera. En el recuadro se aprecia la membrana (flechas) que delimita las células vegetativa y generativa del grano de polen bicelular. In, intina; Ex, exina; nG, núcleo generativo; nV, núcleo vegetativo; v, vacuola. (Aumento = 1000x).

llegan incluso a germinar dentro de la antera; este hecho lo registró Mendes (14) por primera vez en café y fue confirmado también en este trabajo (Figura 11).

El estudio del proceso de microesporogénesis en café facilitará el seguimiento de todos los aspectos relacionados con el desarrollo del polen en condiciones *in vitro*, buscando comprender no sólo el proceso androgénico,

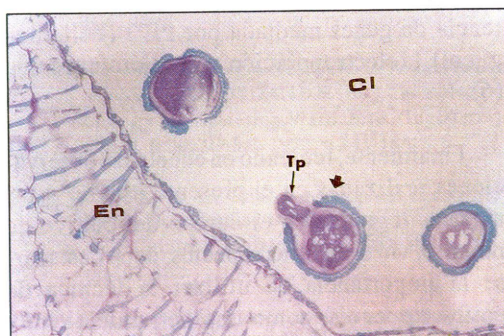


Figura 11. Microspora madura (flecha) que ha iniciado el proceso de germinación dentro del lóculo de la antera. Tp, tubo polínico; En, endotecio; Cl, cavidad locular. (Aumento = 400x).

sino otros aspectos importantes de su biología celular. Estudios relacionados con la regulación del metabolismo celular, la mutagénesis o la bioquímica de la acción de ciertas enzimas, están adelantándose gracias al cultivo de células haploides (8). Así mismo, las investigaciones sobre mecanismos involucrados en la formación del polen, y específicamente los relacionados con la actividad y expresión de ciertos genes permitirán entender mejor el proceso de diferenciación celular del gametofito masculino en las plantas superiores (9, 10, 11).

Otro aspecto importante se relaciona con la manipulación genética, teniendo en cuenta que durante su período de maduración *in vitro*, el polen constituye un excelente blanco para la transferencia de genes y un vector muy útil, dado que la transformación puede realizarse antes de la fusión de los gametos, obviando los problemas de la variación somaclonal y la ocurrencia de quimeras.

Dentro de las técnicas que se han explorado con miras a la transformación genética del polen están: **a)** la polinización con polen irradiado; **b)** la coincubación del polen con extractos de DNA exógeno; **c)** el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*; **d)** la biolística (pistola genética), y **e)** los sistemas basados en la capacidad de regeneración de protoplastos de células haploides, como la transferencia de genes mediada por PEG (Polietilén glicol), la electroporación y la microinyección (6).

Finalmente, teniendo en cuenta las observaciones realizadas en el presente estudio y los avances logrados en el campo del cultivo de polen *in vitro* en otras especies, debe destacarse la importancia de utilizar la técnica de epifluorescencia, como una herramienta muy valiosa para el seguimiento de los procesos de división celular de las microsporas de café, particularmente en estudios relacionados con la androgénesis.

Relación entre el desarrollo de la antera y el grano de polen. El desarrollo de la antera en *Coffea arabica* L. se halla estrechamente relacionado con los procesos de madurez del grano de polen. El análisis realizado a los botones florales mostró que en la medida en que el botón floral crece, la microspora va alcanzando los diferentes estados de desarrollo hasta llegar a su madurez completa (Figura 12).

La correspondencia existente entre cada uno de los estados de desarrollo de la microspora y una longitud específica de la antera sugiere, según Scott (21), que los mecanismos responsables de la activación y expresión de algunos genes específicos se hallan estrechamente ligados al desarrollo de los tejidos somáticos (por parte de la antera) y de las células germinales (polen). Sin embargo, la naturaleza exacta de tal interacción es aún objeto de estudio.

La relación observada entre el desarrollo de la antera y el grano de polen, es de gran utilidad en estudios sobre el desarrollo androgénico (cultivo de anteras o microsporas aisladas), en los cuales es muy importante seleccionar las microsporas en un estado de desarrollo específico que permita una respuesta en cultivo (23), basándose para ello en el tamaño del botón floral o de la misma antera. Así, la caracterización de cada una de estas fases del desarrollo, permitirá seleccionar los botones en el campo de una forma más eficiente y confiable.

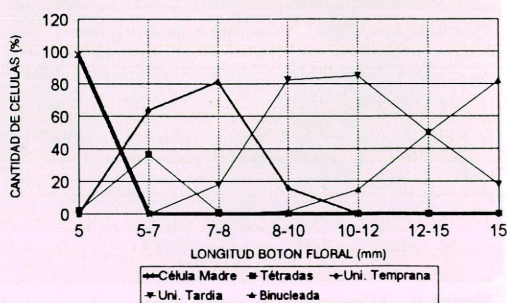


Figura 12. Relación entre el porcentaje de microsporas en diferentes fases de desarrollo y la longitud del botón floral en *Coffea arabica* L. var. Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jaime Arcila P. líder de la disciplina de fisiología vegetal de Cenicafé, por la revisión y sugerencias hechas al texto final.

A la estudiante Sandra C. Rivas por su colaboración en la fijación del material vegetal.

LITERATURA CITADA

1. BLACKMORES.; KNOXR., B. Microspores: Evolution and ontogeny. Cambridge (Inglaterra). Academic-Press Limited. 1990. 347 p.
2. COLEMAN A., W.; GOFF L., J.. Applications of fluorochromes to pollen biology I. Mithramycin and 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA. Stain Technology (Estados Unidos) 60 (3): 145-154. 1985.
3. DEDECA J. M. Recent advances in our knowledge of Coffeetrees. 4. Anatomy. Coffee and Tea Industries and the Flavour Field. 81 (11): 44-50. 1958.
4. ESSAU, K. Anatomía Vegetal. 1a. ed. Barcelona (España). Ediciones Omega S. A., 1972. 779 p.
5. FAHN A.. Plant Anatomy. 4a. ed. Oxford (Inglaterra). Pergamon Press. 1990. 588 p.
6. HEBERLE-BORS, E.; BENITO, M. R. M.; ALLEN, A.; STOGER, E.; VICENTE, O. Transformation of pollen. In: NIJKAMP, H. J. I.; VANDER- PLAS, L.H.W.; VAN-AARTRIJK, J. (Eds.) Progress in plant cellular and molecular biology. Dordrecht (Holanda). Kluwer academic. 1990. p. 244-251.
7. JEAN - PROST P.; MICHEL J.. La botanica y sus aplicaciones agrícolas. Madrid (España), Ediciones Mundiprensa, 1970. 534 p.
8. MAHESHWARI, S. C.; RASHID A.; TYAGI A. K.. Haploids from pollen grains - retrospect and prospect. American Journal of Botany (Estados Unidos) 69 (5): 865-879. 1982.
9. MASCARENHAS J. P.. The male gametophyte of flowering plants. Plant Cell (Estados Unidos) 1(7): 657-664. 1989.
10. MASCARENHAS J. P.. Gene activity during pollen development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (Estados Unidos) 41: 317-338, 1990.
11. McCORMICK, S.. Male gametophyte development. Plant Cell (Estados Unidos) 5 (10): 1265-1275. 1993.
12. MEDINA D. M.. Observacoes citologicas em Coffea. XIII-Observacoes preliminares em *Coffea arabica* L. var. rugosa K. M. C. Bragantia (Brasil) 9(1-4): 47 - 51. 1949.
13. MEDINA D. M.. Observacoes citologicas em Coffea. XIV. Microesporogenese em *Coffea arabica* L. var. Rugosa K. M. C. Bragantia (Brasil) 10 (2): 61 - 66. 1950.
14. MENDES, A. J. T.. Observacoes citologicas em Coffea. XV. Microesporogênese em *Coffea arabica* L. Bragantia (Brasil) 10 (3): 79-87. 1950.
15. MENDES, A. J. T.. Observacoes citologicas em Coffea. XVI. Microesporogenese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia (Brasil) 10 (4): 97-104. 1950.
16. MERCER, E. H.; BIRBERK, H. S. C.. Manual de microscopía electrónica para biólogos. Madrid (España), Ed. Blume, 1974.
17. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum (Dinamarca) 15 (3): 473 -479. 1962.
18. PACE G., M.; REED J., N.; HO L., C.; FAHEY J., W.. Anther culture of maize and the visualization of embriogenic microspores by fluorecent microscopy. Theoretical of Applied Genetics (Alemania) 73: 863-869. 1987.
19. SANTA-RAMA.; JYOTHIP., D.; SREENIVASAN M., S.; RAMALAH P., K.. Cytochemistry of pollen development in Erythrocoffea. Journal of Coffee Research (India) 17(1): 40-49. 1987.
20. SANTA-RAM, A.; SREENIVASAN, M. S.; RAMALAH, P. K.. Pollen development and cytochemistry in Pachycoffea. Café Cacao, Thé. (Francia) 32(2): 99-104. 1988.
21. SCOTT, R.. Anther development: A molecular perspective. In: JORDAN B.R. (Ed.). The molecular biology of flowering. Wallinford (Inglaterra). C.A.B. International. 1993. p 141-184.
22. SCHAEFFER G. W.. Role of microspores and anther culture in advancing technologies. Advances in Cell Culture. (Inglaterra). 7: 161-182. 1989. pp. 161-182.
23. SUNDERLAND N.. Induction of growth in the culture of pollen. In: Yeoman M. M., Truman DES (Eds.). Differentiation in vitro. Cambridge (Inglaterra). British Society Cell Biology Symposium, 1982. V. 4. p.1 - 24.