



<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v72i1.55748>

Microsporogénesis y ultraestructura de los granos de polen de la mora andina *Rubus glaucus* (Rosaceae)


Edgar Javier Rincón-Barón^{1*};  <https://orcid.org/0000-0003-1347-171X>

Gerardo Andrés Torres-Rodríguez²;  <https://orcid.org/0000-0003-2381-2936>

Diego A. Zarate³;  <https://orcid.org/0000-0001-96303927>

Viviana Lucia Cuarán³;  <https://orcid.org/0000-0001-7295-0046>

Carolina Santos-Heredia¹;  <https://orcid.org/0000-0001-7617-0581>

Lilian M. Passarelli⁴;  <https://orcid.org/0000-0002-8870-8622>

1. Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas para la Sostenibilidad-CIBAS, Facultad de Ciencias Naturales; Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud, Universidad de Santander, calle 70 No 55-210, Campus Universitario Lagos del Cacique, Bucaramanga, Colombia; ed.rincon@mail.udes.edu.co (*Correspondencia), car.santos@mail.udes.edu.co
2. Unidad de Microscopía Electrónica, Museo de Historia Natural, Universidad del Cauca, Popayán, Cauca, Colombia, carrera 2 # 1A-25; gator@unicauca.edu.co
3. Centro de Investigación La Suiza, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Km. 32, vía al mar, Vereda Galápagos, Rionegro, Santander, Colombia; dzarate@agrosavia.co, vcuaran@agrosavia.co
4. Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática (LEAVES), Facultad de Ciencias Naturales; Museo de La Plata, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina, 64 entre 120 y diagonal 113, B1904 E; lmpassarelli@yahoo.com.ar

Recibido 06-VII-2023. Corregido 04-III-2024. Aceptado 11-IV-2024.

ABSTRACT

Microsporogenesis and ultrastructure of pollen grains in *Rubus glaucus* (Rosaceae)

Introduction: Studies on the microsporogenesis of *Rubus glaucus* are non-existent and little is known about the ultrastructure of the pollen grains.

Objectives: To describe the microsporogenesis process, and ultrastructural aspects of the pollen grains in *Rubus glaucus*.

Methods: Flowers at different developmental stages were embedded in paraffin. Sections were stained with Safranin-Alcian Blue, PAS-Amidoblack and Lacmoid or included in resin and stained with toluidine blue. Ultrathin sections were examined by transmission electron microscopy (TEM). For scanning electron microscopy (SEM) observation, the material was fixed and dehydrated in 2.2 dimethoxypropane, then with Hexamethyldisilazane (HMDS), and the samples were coated with gold.

Results: Anthers are differentiated by a cellular mass at the ends distal to the staminal filaments. During development, the anther wall presents several cellular layers and at maturity, they are reduced to the epidermis and the endothecium. Microsporocytes undergo simultaneous meiosis and form tetrahedral tetrads. The tapetum develops secretory activity until pollen grains are released, then the cellular content undergoes autolysis. During sporodermis formation, the exine is first deposited and then the intine in a centripetal form. The pollen grains are tricolporate, isopolar, oblate to peroblate, with radial simetry, circular in outline with blunt apices in polar view, ellipsoidal in equatorial view. The exine is thick, tectated, striate perforate. The sporodermis presents an ectexine formed by a tectum interrupted by perforations and thick columellae. Colpus membrane presents small exine granules and orbicules on the surface. The intine develops known structural patterns. Pollenkit is inconspicuous.



Conclusion: Anthers structure and development follows the known patterns of angiosperms. Simultaneous microsporogenesis and centripetal deposition of the sporodermis, as well as ornamentation patterns, have been previously described for the Rosaceae Family.

Key words: blackberry; microspore; palynology; pollen ontogeny; Rosaceae; sporodermis; tapetum.

RESUMEN

Introducción: Los estudios sobre la microsporogénesis de *Rubus glaucus* son inexistentes y poco es conocido sobre la ultraestructura del polen.

Objetivos: Describir la microsporogénesis, y la ultraestructura de los granos de polen en *Rubus glaucus*.

Métodos: Flores en diferentes etapas de desarrollo fueron incluidas en parafina o en resina. Las secciones se tiñeron con Safranin-Alcian Blue, PAS-Amidoblack y Lacmoid o incluidas en resina y teñidas con Azul de Toluidina. Secciones ultrafinas fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Para la observación con microscopía electrónica de barrido (MEB), el material se fijó y se deshidrató en 2.2 dimetoxipropano, luego se usó hexametildisilazano (HMDS) y las muestras se recubrieron con oro.

Resultados: Las anteras se diferencian a partir de una masa celular en los extremos distales de los filamentos estaminales. Inicialmente, la pared de las anteras presenta varias capas celulares y al madurar se reducen a la epidermis y al endotecio. Los microsporocitos experimentan meiosis simultánea y forman tétradas tetraédricas. El tapete desarrolla actividad secretora hasta que se liberan los granos de polen, luego el contenido celular se desorganiza y experimenta autólisis. Al formarse la esporodermis, primero se deposita la exina y luego la intina en forma centrípeta. Los granos de polen son tricolporados, isopolares, oblados a peroblados, con simetría radial, de contorno circular con ápices romos en vista polar, elipsoidales en vista ecuatorial. La exina es gruesa, tectada, perforada estriada. La ectexina está formada por un tectum interrumpido por perforaciones y gruesas columelas. La membrana del colpo posee pequeños gránulos como restos de exina y orbículas en la superficie. La intina desarrolla patrones estructurales conocidos. El pollenit es inconspicuo.

Conclusión: El desarrollo de las anteras sigue los patrones de las angiospermas. La microsporogénesis simultánea, el depósito centrípeta de la esporodermis, y los patrones de ornamentación observados han sido descritos previamente para la Familia Rosaceae.

Palabras clave: esporodermis; microspora; mora; ontogenia del polen; palinología; Rosaceae; tapete.

INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* L. pertenece a la familia Rosaceae (Alice & Campbell, 1999; The Angiosperm Phylogeny Group et al., 2016; Bayer & Kubitzki, 2003) con más de 750 especies y es uno de los géneros más diversos dentro de la familia (Alice & Campbell, 1999; Alice et al., 2014; The Angiosperm Phylogeny Group et al., 2016; Graham & Brennan, 2018; Ramírez, 2023). El género ha sido tradicionalmente subdividido en 12 subgéneros (Focke, 1910; Focke, 1911; Focke, 1914), sin embargo, posteriormente se reconocen 13 subgéneros (Potter et al., 2007); no obstante, la mayoría de estos grupos no son naturales, siendo parafiléticos y polifiléticos (Alice & Campbell, 1999; Carter et al., 2019; Wang et al., 2016).

Rubus es un género con gran número de especies con similares características

morfológicas, así mismo, en este género es común la hibridación, la poliploidía y la apomixis, lo cual ha dificultado la circunscripción específica, convirtiéndolo en un reto sistemático y taxonómico dentro de las angiospermas (Alice & Campbell, 1999; Bayer & Kubitzki, 2003; Clark & Jassieniuk, 2012; Foster et al., 2019; Graham & Brennan, 2018; Weber, 1996). Las especies del género *Rubus* se distribuyen en todos los continentes a excepción de la Antártida, pero son especialmente abundantes en las zonas templadas y subtropicales del hemisferio norte, principalmente en Norte América, Europa y Asia (Alice & Campbell, 1999; Focke, 1910; Focke, 1911; Focke, 1914; Graham & Brennan, 2018; Hummer, 2017; Lu & Bouford, 2003; Ramírez, 2023; Wang et al., 2016), también se registran varias especies en Centro América y los Andes, pocas especies son encontradas en África, Australia y Oceanía

(Araque-Castellanos, et al., 2021; Cancino-Escalante, et al., 2011; Espinosa et al., 2016; Graham & Brennan, 2018; Hummer, 2017; Ramírez, 2023).

A pesar de la importancia económica de muchas especies de plantas pertenecientes al género *Rubus* no se encuentran trabajos detallados relacionados con los procesos ontogénicos de la formación de los granos de polen. Sin embargo, es importante aclarar que se han hecho esfuerzos en la descripción micromorfológica y ultraestructural de los granos de polen maduros en varias especies del género *Rubus*, lo cual ha ayudado en la comprensión y entendimiento de algunos aspectos de su taxonomía, sistemática y evolución (Hebda & Chinnappa, 1994; Kostryco & Chwil, 2021; Kostryco et al., 2020; Lechowicz et al., 2020; Lechowicz et al., 2021; Lechowicz et al., 2022; Wrońska-Pilarek et al., 2012; Xiong et al., 2019).

Rubus glaucus Benth. pertenece al subgénero *Rubus* y es conocida como la mora andina o mora de Castilla, esta especie se distribuye desde Centro América hasta los Andes, donde pasó de ser una especie silvestre a ser una ampliamente cultivada en la región Andina por el sabor y calidad de sus frutos; siendo la mayoría de los trabajos sobre esta especie de tipo agronómico y algunos que resaltan la importancia de esta pluridrupa con potencial fuente de antioxidantes, polifenoles, antocianinas y hasta aplicaciones nanotecnológicas (Araque-Castellanos, et al., 2021; Arozarena et al., 2012; Cancino-Escalante et al., 2011; Espinosa, 2016; Franco et al., 2020; Garzón et al., 2009; Hummer, 2017; Kumar et al., 2017; Mertz et al., 2007; Osorio et al., 2012; Ramírez, 2023; Samaniego et al., 2020).

En relación con los granos de polen en *R. glaucus* Solo López et al. (2019), Padilla et al., (2017), y recientemente Ramírez (2023) describen la micromorfología de los granos de polen maduros, aunque son descripciones generales utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB) y no se hicieron descripciones ultraestructurales con microscopía electrónica de transmisión (MET).

La presente investigación es la primera en abordar de manera pormenorizada el proceso de microsporogénesis en la especie *R. glaucus*, prestando atención especial en la arquitectura y morfología de las células arquesporales, células madre de las microsporas, formación y estructura de la pared de las anteras, descripción del patrón de microsporogénesis, formación de la esporodermis, estructura y función del tapete. En relación con los granos de polen maduros de *R. glaucus*, se presenta aquí por primera vez un estudio completo con microscopía fotónica (MF, MEB y MET), analizando la morfología general, estratificación y ultraestructura de la esporodermis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron más de 30 flores por cada etapa del desarrollo floral empleado. Las muestras fueron obtenidas en la Finca La Fortuna, vereda El Polo, Municipio de Piedecuesta, Santander-Colombia a 1970 m de altitud (7°59'16" N & 72°59'57.1" W) durante el mes de enero del 2022. Las flores se fijaron en una mezcla de formol, etanol y ácido acético (FAA) por 24-48 horas a 6 °C. Posteriormente, se deshidrataron en una serie gradual de etanol y dos pasos de aclaramiento en Xilol (Ruzin, 1999) y se incluyeron en Paraplast plus (Mc Cormick®) durante 12 horas a 55 °C. Se obtuvieron secciones transversales y longitudinales con micrótomos rotatorio MicroTec®, entre 5-7 µm de grosor. Se procedió a la tinción de las muestras con Safranina-azul de Alcian para distinguir estructuras con paredes primarias y secundarias. Adicionalmente, muestras de las flores con anteras maduras también fueron teñidas con la técnica de PAS (Ácido peryódico de Schiff-Amidoblack) para discriminar entre polisacáridos estructurales y de reserva, además de la presencia de proteínas. Se utilizó Lacmoid para teñir calosa y determinar el patrón de microsporogénesis. Para todas las tinciones se procedió de acuerdo con literatura especializada (Demarco, 2017; Rincón-Barón et al., 2020; Rincón-Barón et al., 2021a; Rincón-Barón et al., 2021b; Ruzin, 1999; Soukup, 2014). Muestras adicionales en los



diferentes momentos del desarrollo floral fueron fijadas en Glutaraldehído al 2.5 % en buffer fosfato 0.2 M pH 7.2 durante 24-48 horas a 6 °C. Luego de la fijación, las muestras se lavaron en el mismo buffer seguido de agua destilada para posteriormente post-fijarlas con Tetróxido de Osmio al 2 % por 2 horas a 6 °C en oscuridad y agitación constante. Finalmente, las muestras se deshidrataron durante una hora en una serie ascendente de etanol y durante 12 horas etanol al 100 %. Las muestras se embebieron en mezclas progresivas de óxido de propileno-resina Spurr, por una semana a temperatura ambiente. Se hicieron varios cambios de resina pura durante seis días en agitación constante. La resina fue polimerizada a 60 °C por 48 horas. Se obtuvieron secciones de 0.5-0.7 μm de grosor con cuchillas de vidrio en un Ultramicrotomo Leica Ultracut UCT[®]; las cuales se tiñeron con azul de Toluidina (TBO) en bórax al 1 %, pH 3.6 por 30-60 segundos que además de permitir la descripción entre tejidos de pared primaria y secundaria, permite diferenciar esporopolenina (Rincón-Barón et al., 2021a). Para más datos morfológicos y estructurales, muestras de las anteras maduras procesadas en parafina y teñidas con Safranina Azul de Alcian se examinaron empleando el filtro de triple banda de excitación DAPI-FITC-Texas; el cual incorpora un filtro de excitación con ventanas de paso de banda angostas en las regiones espectrales violeta (395-410 nm), azul (490-505 nm) y verde (560-580 nm). Todas las secciones obtenidas se examinaron con un microscopio fotónico Nikon eclipse Ni equipado con el sistema de contraste diferencial de interferencia (CDI). Las fotografías se obtuvieron con cámara digital Nikon DS-Fi1[®] utilizando el programa NIS Elements versión 4.30.02 de Nikon.

Así mismo y aplicando el procesamiento de las muestras en resina descrito anteriormente se hicieron secciones ultrafinas de 70 a 90 nm de grosor con cuchilla de diamante para MET con el fin de detallar la pared de los granos de polen maduros. Estas secciones se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo durante 10 y 5 minutos respectivamente y se observaron

con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200 EX.

Para llevar a cabo las descripciones morfológicas de los granos de polen con MEB, muestras de las anteras maduras se deshidrataron en 2.2 Dimetoxipropano acidificado por 2 a 3 días, realizando un cambio del solvente durante este tiempo (Halbritter et al., 2018). Finalmente, se hicieron dos cambios en etanol absoluto durante 30 minutos cada uno y se pasó a una mezcla 1:1 Hexametildisilazano (HMDS)- etanol al 100 % durante toda la noche y luego en HMDS puro durante dos horas, posteriormente se permitió que el HMDS se evaporara en desecador de vidrio (Chissoe et al., 1994). Las muestras se montaron sobre cinta conductiva de carbono de doble cara y se recubrieron con oro utilizando un cobertor iónico Quorum SC7620 durante 10 minutos. El porcentaje relativo de granos abortivos se determinó por observación directa y recuento. Las observaciones y registro fotográfico se realizaron en un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss Evo 15 HD. Para las descripciones en general se utilizaron los términos *sensu* Crang et al. (2018), Halbritter et al. (2018) y Punt et al. (2007). Las medidas de los granos de polen maduros están representadas por la medida mínima, media y medida máxima utilizando un N = 30.

RESULTADOS

En *R. glaucus* se pudieron diferenciar cinco estadios del desarrollo floral claramente diferentes a nivel morfoanatómico, estas etapas están relacionadas con los principales eventos ontogenéticos de la formación de las anteras y granos de polen (Fig. 1A). En sección transversal, las flores maduras de *R. glaucus* presentan ovario con múltiples carpelos y gran cantidad de estambres (Fig. 1B). A partir del estado más inmaduro se logró apreciar la presencia de filamentos estaminales en cuyo extremo se desarrolla una masa celular diferenciada, formada por tejido arqueosporico a partir del cual se forma el tapete celular y pared de las anteras (Fig. 1C); para este momento del desarrollo el tapete está constituido por una sola capa

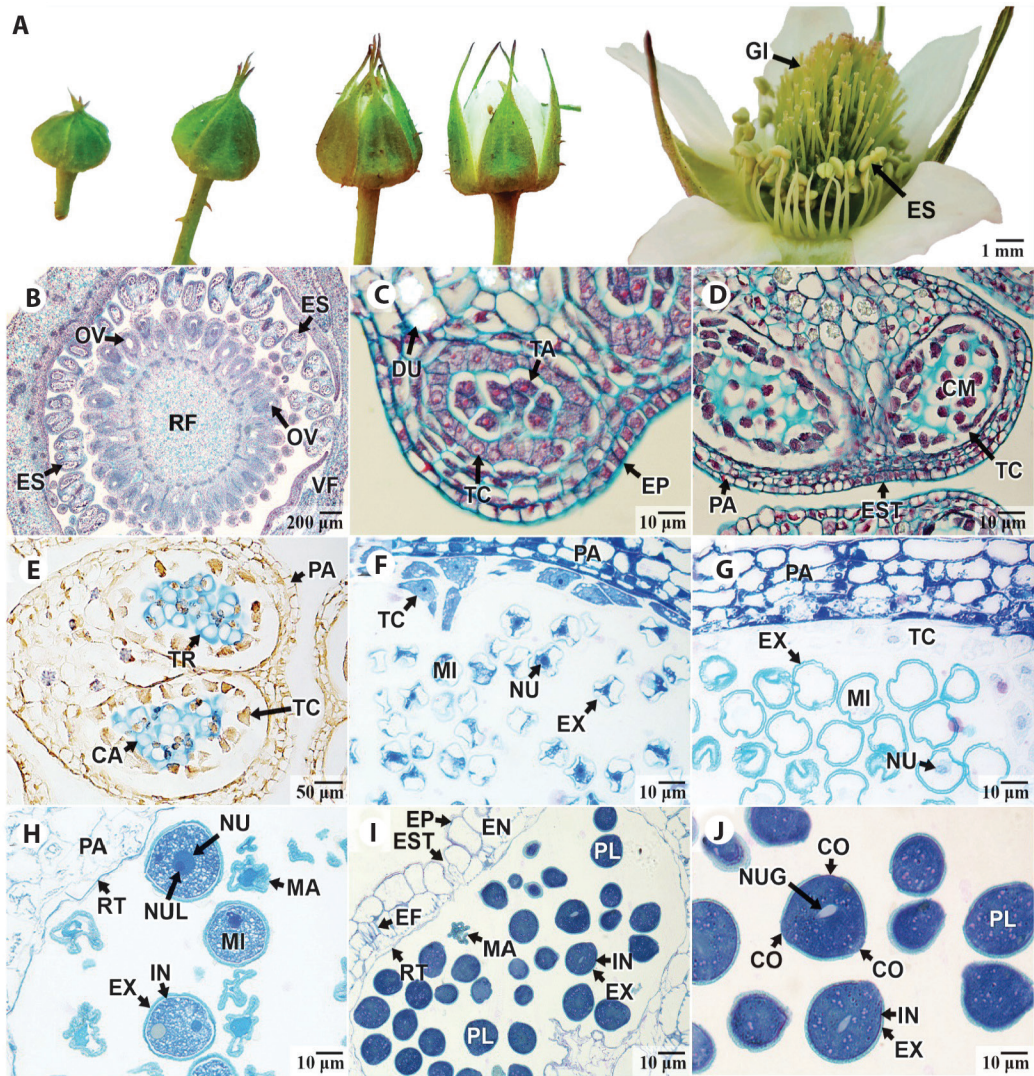


Fig. 1. Microsporogénesis de *Rubus glaucus*. **A.** Estadios del desarrollo floral. **B.** Sección transversal de una flor. Se aprecian los estambres y el ovario con múltiples carpelos. **C.** Región apical del filamento estaminal. Se observa el tejido arquespórico y el tapete. **D.** Anteras diferenciadas. Se detallan las células madre de las microsporas y la pared de las anteras. **E.** Tétrades tetraédricas de microsporas. Se aprecia el tapete celular y calosa alrededor de las microsporas y de las tétrades polínicas (Lacmoid) formando una tinción azul. **F-H.** Microsporas en maduración (Azul de toluidina). En **F.** se aprecia la exina y el tapete secretor. En **G.** la exina se ha engrosado y el tapete secretor persiste. En **H.** se aprecia la exina y la intina, el tapete secretor sufre autólisis. Se aprecian microsporas abortadas. **I-J.** Antera y granos de polen maduros. En **I.** se aprecian los restos o remanentes del tapete. Para este momento del desarrollo en la pared de la antera se observa la epidermis, se ha diferenciado el endotecio y el estomio se percibe claramente. En **J.** se detallan los granos de polen maduros. **CA:** capa de calosa; **CM:** células madre de las microsporas; **CO:** colpo; **DU:** drusas de oxalato de Calcio; **EF:** engrosamientos fibrilares; **EN:** endotecio; **EP:** epidermis; **ES:** estambres; **EST:** zona del estomio; **Ex:** exina; **GI:** gineceo; **IN:** intina; **MA:** microsporas abortadas; **MI:** microsporas; **NU:** núcleo de las microsporas; **NUG:** núcleo del grano de polen; **NUL:** nucleolo; **OV:** Ovario; **PA:** pared de la antera; **PL:** polen; **RF:** receptáculo floral; **RT:** restos del tapete celular; **TA:** tejido arquespórico; **TC:** tapete celular; **TR:** tétrades polínicas tetraédricas; **VF:** verticilos vegetativos. / **Fig. 1.** *Rubus glaucus* microsporogenesis. **A.** Stages of floral development. **B.** Cross section of a flower. The stamens and the ovary with multiple carpels can be seen. **C.** Apical

Continúa en página siguiente...



...viene de la página anterior.

region of the staminal filament. The archesporic tissue and the tapetum are observed. **D.** Differentiated anthers. Microspore mother cells and the anther wall are detailed. **E.** Tetrahedral tetrads of microspores. The secretory tapetum and callose around the microspores in the tetrads (Lacmoid) are appreciated as a blue stain. **F.-H.** Maturing microspores (Toluidine blue). In **F.** The exine and secretory tapetum can be seen. In **G.** the exine has thickened and the secretory tapetum persists. In **H.** the exine and intine can be observed, the secretory tapetum undergoes autolysis. Aborted microspores can be seen. **I.-J.** Anther and mature pollen grains. In **I.** remnants of the cellular tapetum can be observed. By this time of development, the epidermis is notorious in the wall of the anther, the endothecium has differentiated and the stomium can be clearly seen. In **J.** the mature pollen grains are detailed. **CA:** callose layer; **CM:** Microspore mother cells; **CO:** colpus; **DU:** Calcium oxalate druses; **EF:** fibrillar thickenings; **EN:** endothecium; **EP:** epidermis; **ES:** stamens; **EST** stomium area; **Ex:** exine; **GI:** gynoeceium; **IN:** intine; **MA:** aborted microspores; **MI:** microspores; **NU:** microspore nucleus; **NUG:** pollen grain nucleus; **NUL:** nucleolus; **OV:** Ovary; **PA:** anther wall; **PL:** pollen; **RF:** flower receptacle; **RT:** remnants of the cellular tapetum; **TA:** archesporic tissue; **TC:** cellular tapetum; **TR:** tetrahedral pollen tetrads; **VF:** vegetative whorls.

uniestratificada de células de contorno entre rectangular a cuadrado con núcleo en posición central y que ocupa la mayor parte del citoplasma con un prominente nucleolo y citoplasma de apariencia granular. Citológicamente, las células del tejido arquespórico son similares a las del tapete celular, solo que estas presentan un contorno más redondeado y los granos de polen se aprecian tricolporados (Fig. 1J).

Así mismo, en este punto del desarrollo, se aprecia que la pared de las anteras está constituida por una epidermis claramente diferenciada y tres capas de células parietales de apariencia parenquimatosa localizadas entre el tapete y la epidermis (Fig. 1C). Con el crecimiento y maduración, el tejido arquespórico se diferencia para formar las células madre de las microsporas, estas células presentan contorno globoso con paredes primarias engrosadas, un núcleo prominente y se encuentran densamente empaquetadas en el lóculo del microsporangio, rodeadas por una capa uniestratificada de tapete celular; para este momento del desarrollo, la pared de la antera mantiene su estructura morfoanatómica y se empieza a diferenciar el estomio (Fig. 1D). Después de experimentar citocinesis meiótica simultánea, las células madre de las microsporas forman tétrades de microsporas en disposición tetraédrica rodeadas con una gruesa capa de calosa que se observa de color azul claro al teñir con Lacmoid (Fig. 1E). Posteriormente, las microsporas se separan de las tétrades en el lóculo del microsporangio

y estas forman primero la exina que se aprecia de un color azul turquesa al teñirlas con Azul de Toluidina, mientras tanto el tapete mantiene su integridad (Fig. 1F). A medida que las microsporas maduran la exina se va engrosando y en la pared de la antera se aprecia que las células epidérmicas adquieren un contorno rectangular y las tres capas de células parietales se ven más grandes y de contorno rectangular, así mismo el tapete celular persiste (Fig. 1G). Con el progreso de la ontogenia, las microsporas forman la intina que se tiñe de azul oscuro con Azul de Toluidina, las microsporas presentan un citoplasma de apariencia vacuolada y un núcleo con un prominente nucleolo, en el microsporangio es posible observar abundantes microsporas abortadas (alrededor del 33 %) y el tapete ha experimentado autólisis (Fig. 1H).

Finalmente, las microsporas se diferencian para formar los granos de polen maduros, cuyo citoplasma se tiñe intensamente de azul oscuro con Azul de Toluidina (Fig. 1I, Fig. 1J); para este momento de la microsporogénesis, se evidencia que en pared de la antera se ha diferenciado el endotecio a partir de las células parietales parenquimatosas, y este está formado por dos estratos de células de contorno rectangular con engrosamientos fibrilares lignificados; así mismo, el estomio se ha estructurado por completo (Fig. 1I). Para el momento de la liberación de los granos de polen, la exina e intina se han desarrollado

Justo para el momento de la antesis, los granos de polen maduros presentan abundantes gránulos de almidón, los cuales se evidencian por la coloración purpura al usar la tinción de PAS-Amidoblack (Fig. 2A). Al observar las secciones de las anteras maduras con fluorescencia teñidas con Safranina-Azul de alcian y empujando el filtro de triple banda de excitación DAPI-FITC-Texas, las microsporas abortadas son evidentes y se aprecia que el endotecio ha alcanzado su mayor grado de desarrollo, con engrosamientos fibrilares fuertemente lignificados (Fig. 2B).

Los granos de polen son liberados en mónades, tricorporados, isopolares, con simetría radial, pequeños P: (10) 12.3 (14) μm x E: (22) 24.5 (27) μm (Fig. 1J), P/E: 0.5 (Fig. 2C), oblatos a peroblados (Fig. 2C). Presentan AMB de contorno triangular, con vértices romos en vista polar, elipsoidales en vista ecuatorial (Fig. 2D). Colporo formado por un colpo de 20 (21.6) 26.2 μm , por entre 10 (12) 14 y un poro notablemente expuesto (Fig. 2D, Fig. 2E), el colpo se extiende hasta los polos (Fig. 2D, Fig. 2E, Fig. 2F). La membrana del colpo presenta repliegues, con abundantes microgránulos, constituidos por ectexina (es la capa que se encuentra en la zona más externa de la exina), y por orbículas depositadas sobre la superficie (Fig. 2E, Fig. 2F). Exina bien desarrollada de 1.2-1.4 μm , tectada, estriado-perforada, con estrias paralelas al eje polar distribuidas en forma homogénea y perforaciones de diámetro variable menores a un micrómetro (Fig. 2F). La ultraestructura de la esporodermis observada con MET, muestra que la exina está formada por dos capas, la ectexina, constituida por un tectum continuo en zonas con columelas unidas y por zonas interrumpidas, en las que quedan báculas libres formando las perforaciones en el tectum (Fig. 2G), y la endexina compacta de menor grosor (capa más interna de la exina) (Fig. 2H). La intina es delgada en la zona interabertural (0.3 μm), notoriamente extendida en las aberturas con el doble de espesor (0.6 μm) (Fig. 2I). En las secciones y montajes hechos para MET y MEB no se aprecia polenkit.

DISCUSIÓN

En la familia Rosaceae son escasos los trabajos que describan los procesos de formación de las anteras (Çetinbaş & Ünal, 2015; Sumner & Remphrey, 2005) y microsporogénesis; la mayoría se enfoca en otras plantas de interés económico, como duraznos, ciruelas y cerezas (Akšić et al., 2016; Çetinbaş & Ünal, 2015; Fadón et al., 2019; Feng et al., 2016; Hajnal et al., 2013; Julian et al., 2011; Ontivero et al., 2005; Radice & Galati, 2006; Rahmani et al., 2012; Sumner & Remphrey, 2005; Szalay & Remphrey, 2002; Ye et al., 2010). En una primera etapa se forma una masa celular diferenciada en el extremo distal de los filamentos estaminales; esta masa llamada tejido arqueosporico formará las células madre de las microsporas y los tejidos vegetativos que constituirán la pared de las anteras. Esta pared está formada por varios estratos celulares, en las etapas tempranas del desarrollo, pero una vez que la antera alcanza la madurez, justo para el momento de la liberación de los granos de polen, termina formada por el endotecio y el tejido epidérmico en tanto que los demás estratos celulares parietales degeneran (Çetinbaş & Ünal, 2015). Este patrón histológico es similar en estructura y función al observado aquí por primera vez en *R. glaucus* y coincide con el patrón general que presenta la mayoría de las eudicotiledóneas (Åstrand et al., 2021; Davis, 1966; Fernández et al., 2015; Kostryco & Chwil, 2021; Rincón-Barón et al., 2021b; Rincón-Barón et al., 2023).

En similitud a lo descrito en otras Rosaceae, la formación del endotecio en *R. glaucus* comienza después de la meiosis y termina por diferenciarse por completo para el momento de la liberación del polen. Una vez que alcanza su maduración, estructuralmente presenta engrosamientos fibrilares lignificados (Çetinbaş & Ünal, 2015; Fadón et al., 2019; Kostryco & Chwil, 2021; Radice & Galati, 2006; Rahmani et al., 2012). Sin embargo y en contraste a lo anteriormente descrito por estos autores para la familia, el endotecio en *R. glaucus* está formado por dos estrados celulares en lugar de solo uno.

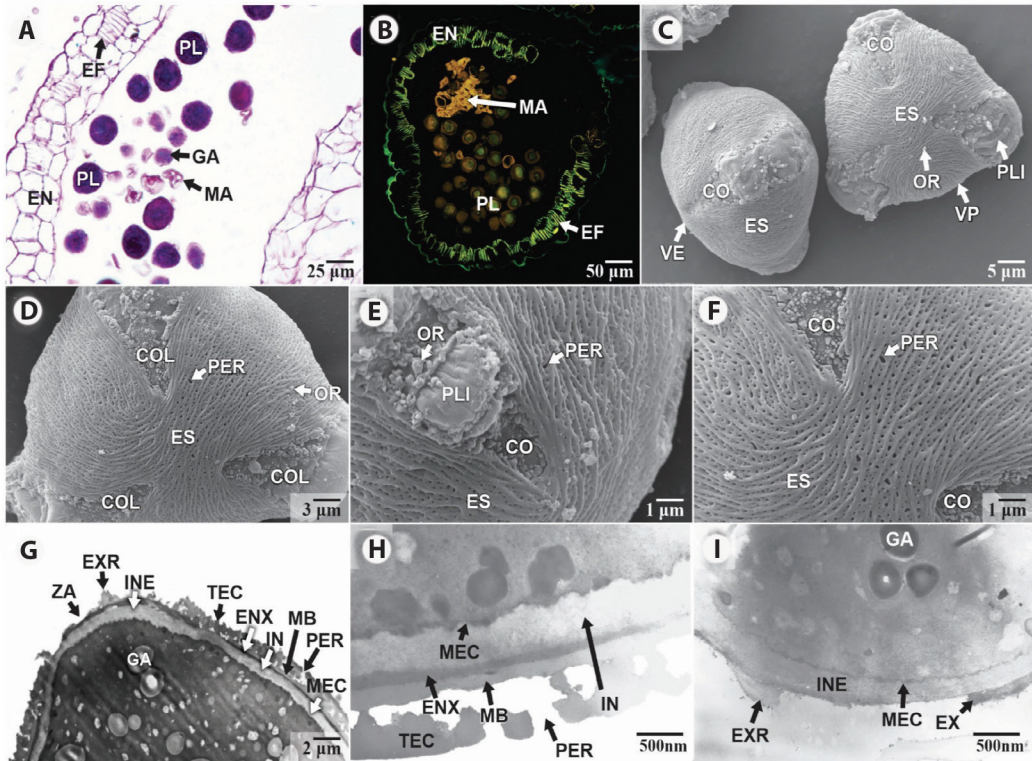


Fig. 2. Anteres y detalles morfológicos y ultraestructura de los granos de polen de *Rubus glaucus*. **A-B.** Sección trasversal de las anteras. En **A.** se observan microsporas abortadas y en el citoplasma de los granos de polen se aprecian abundantes gránulos de almidón (PAS-Amidoblack). En **B.** se aprecian microsporas abortadas; además que el endotectio está formado por dos estratos celulares (Filtro DAPI-FITC-Texas, PAS-Amidoblack). **C.-F.** Granos de polen observados con MEB. En **C.** detalles de los granos de polen tricolporados en vista ecuatorial y polar. Se reconoce la forma oblada. **D.** detalle de los granos de polen en vista polar, se aprecian los colpi con orbículas en la superficie. **E.** se detalla el colporo y los pliegues de la membrana del colpo con orbículas sobre la superficie. En **F.** detalle de la microrramentación de la esporodermis con estrías paralelas al eje polar y perforaciones. **G.-I.** Granos de polen observados con MET. En **G.** detalle de la esporodermis, se observa la exina y la intina más engrosada en la zona abertural. En **H.** detalle de la ultraestructura de la esporodermis, se aprecia la exina formada por tectum y endexina. En el tectum se observan las perforaciones y debajo las columelas. La membrana basal se aprecia como una capa homogénea electrolúcida y la endexina como una capa electropaca y la intina más gruesa. En **I.** detalle ultraestructural de la esporodermis en la región abertural. La intina se aprecia más engrosada en esta zona y se observa restos de exina que forman el pliegue de la membrana del colpo. **CO:** colpo; **COL:** colporo; **EF:** engrosamientos fibrilares del endotectio; **EN:** endotectio; **ENX:** endexina; **ES:** estrías; **EX:** exina; **EXR:** restos de exina que forman el pliegue sobre el colpo; **GA:** gránulos de almidón; **IN:** intina; **INE:** intina engrosada en la abertura; **MA:** microsporas abortadas; **MB:** membrana basal; **MEC:** membrana citoplasmática; **OR:** orbículas; **PER:** perforaciones del tectum; **PL:** polen; **PLI:** pliegues sobre la membrana del colpo; **TEC:** tectum; **VE:** polen vista ecuatorial; **VP:** Polen vista polar; **ZA:** zona de la abertura. / **Fig. 2.** Anthers and morphological details and ultrastructure of *Rubus glaucus* pollen grains. **A.-B.** Cross section of the anthers. In **A.**, aborted microspores are observed, and abundant starch granules (PAS-Amidoblack) are observed in the cytoplasm of the pollen grains. In **B.**, aborted microspores can be seen; In addition, the endothecium is made up of two cell layers (DAPI-FITC-Texas Filter, Safranin-alcian blue). **C.-F.** Pollen grains observed with SEM. In **C.** details of tricolporate pollen grains in equatorial and polar view. Oblate shape is recognized. **D.** Detail of the pollen grains in polar view, showing the colpi and the micro-ornamentation of the sporodermis with orbicules on the surface. In **E.**, the colpulus and the folds of the colpulus membrane with orbicules on the surface are detailed. In **F.**, detail of the micro-ornamentation of the sporodermis with striations parallel to the polar axis and perforations. **G.-I.** Pollen grains observed with MET. In **G.** detail of the sporodermis, the exine and the thickened intine are observed in the aperture area. In **H.** detail of the ultrastructure of the sporodermis, the

Continúa en página siguiente...

...viene de la página anterior.

exine formed by tectum and endexine can be observed. Perforations can be seen in the tectum and under it the columellae are distinguished. The foot layer is seen as a homogeneous electropaque layer and the intine is thicker and more electrolucent. In **I.** ultrastructural detail of the sporodermis in the aperture zone. The intine is thickened in this area and exine and the remnants of the exine forming folds on the colpus are observed. **CO:** colpus; **COL:** colporus; **EF:** fibrillar thickenings of the endothecium; **EN:** endothecium; **ENX:** endexine; **ES:** striae; **EX:** exine; **EXR:** exine remnants that form the fold over the colpus; **GA:** starch granules; **IN:** intine; **INE:** thickened intina at the aperture; **MA:** aborted microspores; **MB:** foot layer; **MEC:** membrana citoplasmática; **OR:** orbicules; **PER:** tectum perforations; **PL:** pollen; **PLI:** folds on the colpus membrane; **TEC:** tectum; **VE:** pollen equatorial view; **VP:** pollen polar view; **ZA:** aperture zone.

En la mayoría de las especies de Rosaceae se ha indicado la presencia del tapete secretor (Çetinbaş & Ünal, 2015; Fadón et al., 2019; Feng et al., 2016; Julian et al., 2011; Kostryco & Chwil, 2021; Ontivero et al., 2005; Radice & Galati, 2006; Sumner & Remphrey, 2005; Watson & Dallwitz, 1991) presente hasta el momento de la liberación de los granos de polen, entonces sufre autólisis y degenera hasta desaparecer, situación que se pudo apreciar en esta investigación para el tapete secretor de *R. glaucus*. Otros autores indicaron la presencia de tapete plasmodial en algunas especies de Rosaceae (Bhojvani & Soh, 2010; Rahmani et al., 2012). Dado el estrecho contacto que se observó entre las células madre de las microsporas y el tapete secretor de *R. glaucus*, este facilitaría la maduración de estas células reproductivas, así como, proporciona materia prima para la formación de la exina (Fernández et al., 2015; Furness & Rudall, 2004; Furness et al., 2002; Pacini, 2010; Rincón-Barón et al., 2021b; Rincón-Barón et al., 2023).

En *R. glaucus* la microsporogénesis es simultánea y se forman tétrades de microsporas en disposición tetraédrica con una gruesa capa de calosa, este proceso culmina con la formación de granos de polen tricolporados, lo cual es ampliamente conocido en eudicotiledóneas incluidas las Rosaceae y se explica por depósitos de calosa y los puntos de contacto de las microsporas en la tétrade (Çetinbaş & Ünal, 2015; Fadón et al., 2019; Feng et al., 2016; Furness & Rudall, 2004; Furness et al., 2002; Julian et al., 2011; Ontivero et al., 2005; Radice & Galati, 2006; Rahmani et al., 2012; Sumner & Remphrey, 2005).

En cuanto al depósito de la esporodermis en *R. glaucus* se forma primero la exina que está compuesta principalmente de esporopolenina y luego se deposita la intina formada de componentes de pared primaria, este patrón de depósito centrípeto de la esporodermis es coincidente con el descrito habitualmente en plantas (Blackmore et al., 2007; Pacini & Hesse, 2012; Rincón-Barón et al., 2021a; Rincón-Barón et al., 2021 b; Rincón-Barón et al., 2023).

En los lóculos de los microsporangios en las anteras de *R. glaucus* es posible observar abundantes microsporas abortadas (33%), esta situación podría explicarse en parte por los niveles de ploidía presentes en *R. glaucus* tal y como lo señalan López et al. (2019). No obstante, existen abundantes referencias donde indican la susceptibilidad de la microsporogénesis a factores abióticos principalmente relacionados con la temperatura y humedad, que pueden afectar estos procesos de manera negativa llevando a la menor producción de granos de polen maduros y viables (Åstrand et al., 2021; Aronne et al., 2021; De Storme & Geelen, 2014; Dolferus et al., 2011; Hedhly, 2011; Iovane & Aronne, 2022; Pacini & Dolferus, 2019; Rosbakh et al., 2018; Thakur et al., 2010). Estos trabajos señalan que los factores ambientales relacionados con el estrés por calor, bajas temperaturas y sequía afectan en especial al tapete, que siendo un tejido tan importante en varios pasos claves de las actividades metabólicas de la microsporogénesis, puede perturbar la formación de los granos de polen desde la meiosis, interfiriendo con la posición natural de los microtúbulos y por consiguiente afectando la correcta separación de las microsporas



e incluso llevando a la segregación anormal de los cromosomas. Así mismo, estos autores indican que daños en el tapete causados por los factores de estrés señalados, pueden afectar desde el metabolismo de los carbohidratos en especial de almidones y otros azúcares, hasta interferir con los depósitos de precursores de la esporopolenina a nivel de la exina, comprometiendo así el desarrollo de la esporodermis y por consiguiente interfiriendo dramáticamente en la formación de los granos de polen, todo lo anterior podría estar relacionado con el alto porcentaje de microsporas abortadas observadas en *R. glaucus*.

Aunque el estrés por temperatura y humedad también pueden afectar a otras capas de la pared de las anteras (Pacini & Dolferus, 2019; Rosbakh et al., 2018) interfiriendo incluso en la dehiscencia de estas y por ende la liberación de los granos de polen maduros; en este trabajo con *R. glaucus* no fue evidente ningún tipo de alteración morfoanatómica que afectara a estos tejidos y por consiguiente a la abertura del estomio. Adicionalmente, Aronne et al. (2021), Iovane & Aronne (2022) y Pacini & Dolferus (2019), han indicado que incluso el efecto adverso de los factores abióticos sobre la microsporogénesis no necesariamente estaría relacionado con largas exposiciones a estos tipos de estrés, e indican que períodos cortos de exposición al calor, frío o sequía durante los momentos más susceptibles de la microsporogénesis, pueden afectar drásticamente la formación y desarrollo de los gametofitos masculinos. Por lo anterior, estos mismos autores resaltan la relación existente entre el cambio climático y el efecto adverso sobre la formación del polen que puede intervenir de manera negativa en la agricultura y producción de alimentos, por consiguiente, la necesidad de prestar atención a estos aspectos de la biología reproductiva de plantas que impacta directamente sobre la seguridad alimentaria.

En cuanto a la morfología, varios trabajos describen al polen de la familia Rosaceae, incluyendo a especies de *Rubus*, este género es uno de los más numerosos en la Familia aproximadamente 750 especies (Alice et al., 2014;

The Angiosperm Phylogeny Group et al., 2016; Graham & Brennan, 2018; Ramírez, 2023), y teniendo en cuenta su diversidad palinológica, muy bien documentada por Hebda et al. (1994) en referencia a la Subfamilia Rosoideae como la más heterogénea, se puede caracterizar como euripalínico (Erdtman, 1969; Halbritter et al., 2018), a diferencia de lo expresado por Monasterio-Huelin & Pardo (1995). Eide (1981) realiza una amplia descripción de las aberturas y de la compleja ornamentación de las especies europeas de las Familia Rosaceae, entre ellas, seis especies de *Rubus*. Describe una ornamentación positiva microreticulada perforada, rugulada perforada, estriado microreticulada, estriado perforada, característica de *Rubus*, aunque no exclusiva de este taxon, ya que en otros géneros como *Physocarpus* (CAMBESS.) RAF. y *Spiraea* L. por ejemplo, se repite el mismo patrón de escultura. Dentro de *Rubus* subgen. *Chamamemorus*, un taxón monotípico considerado linaje basal en el género (Alice & Campbell, 1999) se observa otro tipo de ornamentación, equinada o verrucosa. Estos autores concluyen en que los principales tipos polínicos de las Rosaceae son variaciones del mismo carácter tricolporado estriado.

Así mismo, Hebda & Chinnappa (1990) detallan la morfología de especies canadienses de Rosaceae, incluyendo a *Rubus* y las ilustra con una ornamentación positiva suave y presencia de perforaciones, lo cual es coincidente con los trabajos previos ya mencionados y es similar a lo observado en *R. glaucus*. Un trabajo más reciente (Xiong et al., 2019) basado en un amplio estudio de 155 especies y 13 variedades de *Rubus* representando a los doce subgéneros, caracteriza a los diferentes taxones dando todas las descripciones conocidas hasta el momento, incluyendo a las medidas de los ejes polar y diámetro ecuatorial de las especies estudiadas siendo los valores generales aportados, mayores que los observados aquí, este estudio no encuentra valor taxonómico en los granos de polen. Kostryco et al. (2020) intentan completar la micromorfología y ultraestructura de diferentes cultivares de *R. idaeus* observando estrías paralelas que pueden ramificarse en

forma dicotómica o anastomosarse irregularmente. En este caso, *R. glaucus* presenta un tamaño pequeño a mediano coincidiendo con la mayoría de las especies de *Rubus* descritas por diferentes autores (Eide, 1981; Hebda & Chinnappa, 1990; Lechowicz et al., 2022; López et al., 2019; Padilla et al., 2017; Ramírez, 2023), por otra parte, la forma oblada es algo menos frecuente en este taxón (Hanchana et al., 2023; Lechowicz et al., 2022).

Adicionalmente, en *R. glaucus* la ornamentación presenta estrías, éstas son rectas, pudiendo contactarse brevemente en algunos sitios de la zona ecuatorial, se observan, además perforaciones de diámetro variable sobre toda la superficie de la esporodermis. Xiong et al. (2019) describen seis grupos diferentes en base a las perforaciones, aquellos con agujeros menores a un micrómetro, mayores a un micrómetro, con diámetros mixtos y con diferentes patrones de distribución. El grupo tres con estrías y perforaciones, aunque heterométricas y menores a un micrómetro, coincide con la mayoría de las especies incluso *R. glaucus*.

La presencia de orbículas en especies del género *Rubus* puede observarse en los distintos trabajos citados, aunque en la mayoría no se hace mención a este carácter (Hebda & Chinnappa, 1994; Tomlik-Wyremblewska et al., 2004). Cada vez más atención se pone sobre estas estructuras producidas por el tapete, constituidas por esporopolenina que se distribuyen sobre la superficie interna de las anteras y de los granos de polen, y que por conservar su morfología pueden aportar a la caracterización incluso a nivel de especie (Ruggiero & Bedini, 2020; Verstraete et al., 2014); sin embargo, aún se desconoce su función, aunque está demostrado que la presencia de orbículas en las plantas con flores marca una tendencia evolutiva hacia la ausencia ya que en los clados considerados más evolucionados estas estructuras no se observan, por ejemplo faltan en Asteraceae y Lamiaceae (Verstraete et al., 2014).

Song et al. (2017) realizan un amplio estudio por primera vez, sobre la presencia de orbículas en la Tribu Spireae, señalando que están presentes sólo en tres géneros y reconocen a la

ausencia de su distribución como una sinapomorfía de los clados derivados, algo ya propuesto por Verstraete et al. (2014). Todos los géneros de la tribu Sorbarieae presentan orbículas (Song et al., 2016), la mayoría de estas estructuras se encuentran agregadas o embebidas en el tejido tapetal. Ocasionalmente, en *R. glaucus* según lo observado en este trabajo, las orbículas pueden fusionarse y formar pequeños agregados. Este carácter ha sido comúnmente observado, además, en otras especies de Angiospermas (Galati, 2003; Galati & Strittmatter, 1999).

En cuanto a la ultraestructura de la pared, en *R. glaucus* se distingue fácilmente la presencia de un tectum, columelas y capa basal. Esta estructura de la esporodermis está presente en todas las angiospermas eudicotiledóneas incluidas las especies de la familia Rosaceae con muy pocas excepciones generalmente relacionadas con adaptaciones al ambiente como, por ejemplo, el infratectum granular que ocurre en *Nymphaeae gardneriana* (Zini et al., 2017) y es, además, característico de las angiospermas basales (Doyle, 2005). Las diferentes capas de la pared presentan grosores y características variadas (Blackmore, 2007; Halbritter et al., 2018; Hickey & Wolfe, 1975; Kostrycy et al., 2020; Song et al., 2017). Kostrycy et al. (2020) incorporan a su estudio en *R. idaeus* L. los detalles con MET, encontrando diferencias a nivel de cultivares en el grosor de las capas, mencionan a la ectexina como una zona muy gruesa y que forma el 80 % del grosor total de la pared, este carácter coincide con lo observado aquí para *R. glaucus* ya que en los cortes ultrafinos la capa externa de la exina, la ectexina, forma casi la totalidad de esta estructura. En las figuras se demuestra claramente la ornamentación negativa mediante interrupciones del tectum. Las columelas son gruesas y pueden observarse unidas debajo de esta estructura.

La presencia de polenkit no ha sido notoria en *R. glaucus*, sin embargo, es visible en otras especies del género (Kostrycy et al., 2020). Llama la atención la ausencia de este material en *R. glaucus* atendiendo a la relación estrecha entre el polenkit y el síndrome de polinización (Konzmann et al., 2019; Pacini & Hesse, 2005;



Rincón et al., 2021a), ya que en *R. glaucus* se ha indicado polinizadores como abejas, avispas, abejorros, moscas y hormigas (Bolaños et al., 2020; Franco et al., 2020; López et al., 2019; Ramírez, 2023); y también fenómenos de polinización por viento (Ramírez, 2023), o podría tratarse de un depósito fino sobre los granos de polen que luego desaparece de la superficie, quedando a veces entre las cavidades internas delimitadas por las columelas infratectales. Un pormenorizado estudio sobre este tema es aportado por Pacini & Hese (2005), teniendo en cuenta las diferentes formas de distribución y funciones de este material, sería necesario continuar con estos estudios tendientes a dar luz a aspectos fisiológicos de la microsporogénesis por un lado y aportando a la controvertida sistemática mediante la morfología del polen y la distribución de las orbículas. Así mismo, entender a detalle el proceso de microsporogénesis en plantas aportan información relevante sobre su evolución, biología reproductiva y aplicaciones en el mejoramiento agronómico de plantas.

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las siguientes instituciones y personas: a la Universidad de Santander (UNDES) por el apoyo financiero y a la Universidad del Cauca (UNICAUCA) por su apoyo técnico e infraestructura. A Luis Abelardo Rey Velandia propietario de la finca la Fortuna por facilitarnos sus cultivos para la toma del material. A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), y al macroproyecto “Desarrollo integral de

modelos productivos sostenibles para el cultivo de la Mora en Colombia”

REFERENCIAS

- Akšić, M. F., Cerović, R., Ercišli, S., & Jensen, M. (2016). Microsporogenesis and meiotic abnormalities in different ‘Oblačinskašour cherry (*Prunus cerasus* L.) clones. *Flora*, 219, 25–34.
- Alice, L. A., & Campbell, C. S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86(1), 81–97.
- Alice, L. A., Goldman, D. H., Macklin, J. A., Moore, G. (2014). *Rubus*. En: Flora of North America Editorial Committee (Ed.), *Flora of North America north of Mexico* (Vol. 9, pp 28–56). Oxford University Press.
- The Angiosperm Phylogeny Group, Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S., & Stevens, P.F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.
- Araque-Castellanos, D., Cancino-Escalante, G., Hernandez-Contreras, D. A., & Chinchilla-Cárdenas, D. (2021). Diversidad genética de *Rubus glaucus* Benth en el municipio de Pamplona (nororiente de Colombia). *BISTUA Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 19(2), 8–14.
- Aronne, G., Iovane, M., & Strumia, S. (2021). Temperature and humidity affect pollen viability and may trigger distyly disruption in threatened species. *Annali Di Botanica*, 11, 77–82.
- Arozarena, I., Ortiz, J., Hermosín-Gutiérrez, I., Urretavizcaya, I., Salvatierra, S., Córdova, I., & Navarro, M. (2012). Color, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7463–7473.
- Åstrand, 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(4), 307–319.
- Bayer, C., & Kubitzki, K. (2003). Malvaceae. En K. Kubitzki (Ed.), *The families and genera of vascular plants* (pp. 225–31). Springer-Verlag.
- Bhojvani, S. S., & Soh W. Y. (2010). *Current trends in the embryology of Angiosperms*. Springer.
- Blackmore, S., Wortley, A. H., Skvarla, J. J., & Rowley, J. R. (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist*, 174(3), 483–498.

- Bolaños, M. M., Cardona, W. A., García, M. C., Zapata, Y. A., Beltrán, C. R., Vásquez, R. E., Martínez, E. P., Clímaco, J., Ortega, N. C., Peña, A. C., Bautista, L. G., & López, D. A. (2020). Mora (*Rubus glaucus* Benth.): Manual de recomendaciones técnicas para su cultivo en el departamento de Cundinamarca. *Corredor Tecnológico Agroindustrial CTA-2*.
- Cancino-Escalante, G. O., Sánchez-Montaño, L. R., Quevedo-García, E., & Díaz-Carvajal, C. (2011). Caracterización fenotípica de accesiones de especies de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia. *Universitas Scientiarum*, 16(3), 219–233.
- Carter, K. A., Liston, A., Bassil, N. V., Alice, L. A., Bushakra, J. M., Sutherland, B. L., Mockler, T. C., Bryant, D. W., & Hummer, K. E. (2019). Target capture sequencing unravels *Rubus* evolution. *Frontiers in plant science*, 10, 1–18.
- Çetinbaş, A., & Ünal, M. (2015). Developmental and Cytochemical Features of Male Reproductive Organ in *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 507–514.
- Chisoe, W. F., Vezey, E. L., & Skvarla, J. J. (1994). Hexamethyldisilazane as a drying agent for pollen scanning electron microscopy. *Biotechnic & Histochemistry*, 69(4), 192–198.
- Clark, L. V., & Jasieniuk, M. (2012). Spontaneous hybrids between native and exotic *Rubus* in the Western United States produce offspring both by apomixis and by sexual recombination. *Heredity*, 109(5), 320–328.
- Crang, R., Lyons-Sobaski, S., & Wise, R. (2018). *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants*. Springer.
- Davis, G. L. (1966). *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley & Sons Inc.
- De Storme, N., & Geelen, D. (2014). The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant, cell & environment*, 37(1), 1–18.
- Demarco, D. (2017). Histochemical analysis of plant secretory structures. En C. Pellicciari & M. Biggiogera, (Eds.), *Histochemistry of single molecules methods and protocols* (pp. 313–330). Humana Press.
- Dolferus, R., Ji, X., & Richards, R. A. (2011). Abiotic stress and control of grain number in cereals. *Plant science*, 181(4), 331–341.
- Doyle, J. (2005). Early evolution of angiosperm pollen as inferred from molecular and morphological phylogenetic analyses. *Grana*, 44, 227–25.
- Eide, F. Y. (1981). Key for northwest european rosaceae pollen. *Grana*, 20(2), 101–118.
- Erdtman, G. (1969). *Handbook of Palynology: An introduction to the study of pollen grains and spores*. Munksgaard, Copenhagen.
- Espinosa, B. N., Ligarreto, M. G. A., Barrero, M. L. S., & Medina, C. C. I. (2016). Variabilidad morfológica de variedades nativas de mora (*Rubus* sp.) en los Andes de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 211–221.
- Fadón, E., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2019). Anther and pollen development in sweet cherry (*Prunus avium* L.) in relation to winter dormancy. *Protoplasma*, 256, 733–744.
- Feng, Y., Cai, Y., Zhang, X., Gao, T., Mu, X., & Liang, C. (2016). Microsporogenesis and male gametophyte development in *Prunus mahaleb* Linn. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(5), 514–519.
- Fernández, G. J., Talle, B., & Wilson, Z. A. (2015). Anther and pollen development: a conserved developmental pathway. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(11), 876–891.
- Focke, W. O. (1910). *Species Ruborum: Monographiae Generis Rubi Prodrum* (Pars I). Bibliotheca Botanica.
- Focke, W. O. (1911) *Species Ruborum, Monographiae Generis Rubi Prodrum* (Pars II). Bibliotheca Botanica.
- Focke, W. O. (1914) *Species Ruborum, Monographiae Generis Rubi Prodrum* (Pars III). Bibliotheca Botanica.
- Foster, T. M., Bassil, N.V., Dossett, M., Leigh Worthington, M., & Graham, J. (2019). Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: A roadmap for the future. *Horticulture research*, 6, 1–9.
- Franco, G., Bernal Estrada, J. A., Díaz Diez, C. A., Tamayo Vélez, Á., Tamayo Molano, P. J., Orrego, C. E., ... & Cotes Prada, A. M. (2020). Tecnología para el cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA.
- Furness, C. A., Rudall, P. J., & Sampson, F. B. (2002). Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 163(2), 235–260.
- Furness, C. A., & Rudall, P. J. (2004). Pollen aperture evolution—a crucial factor for eudicot success? *Trends in Plant Science*, 9(3), 154–158.
- Galati, B. G. (2003). Ubisch bodies in Angiosperms. En A. K. Pandey & M. R. Dhakal (Eds.), *Advances in Plant Reproductive Biology*, Vol. II (pp. 1–21). Narendra Publishing House.
- Galati, C., & Strittmatter, L. I. (1999). Correlation between pollen development and Ubisch bodies ontogeny in *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae). *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, 71(2), 249–260.



- Garzón, G. A., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2009). Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.). *Journal of food science*, 74(3), 227–232.
- Graham, J., & Brennan, R. (2018). Introduction to the *Rubus* Genus. En Graham, J. & Brennan, R. (Eds.), *Raspberry: breeding, challenges and advances* (pp. 1–16). Springer.
- Hajnal, V., Omid, Z., Ladanyi, M., Tóth, M., & Szalay, L. (2013). Microsporogenesis of Apricot Cultivars in Hungary. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 434–439.
- Halbritter, H., Ulrich, S., Grimsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M., & Frosch-Radivo, A. (2018). *Illustrated pollen terminology* (2nd Ed.). Springer.
- Hanchana, K., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2023). Pollen morphology and anatomy of *Rubus* L. (Rosaceae) in Thailand. *Notulae Botanicae, Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca*, 51(1), 1–41.
- Hebda, R. J. & Chinnappa, C. C. (1990). Studies on pollen morphology of Rosaceae in Canada. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 64(1–4), 103–108.
- Hebda, R. J., & Chinnappa, C. C. (1994). Studies on pollen morphology of Rosaceae. *Acta Botanica Gallica*, 141(2), 183–193.
- Hedhly, A. (2011). Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 9–16.
- Hickey, L. J., & Wolfe, J. A. (1975). The bases of angiosperm phylogeny: vegetative morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 62(3), 538–589.
- Hummer, K. E. (2017). Blackberries: An introduction. En H. K. Hall & R. C. Funt (Eds), *Blackberries and their hybrids* (pp. 1–16). CAB International.
- Iovane, M., & Aronne, G. (2022). High temperatures during microsporogenesis fatally shorten pollen lifespan. *Plant Reproduction*, 35, 9–17.
- Julian, C., Rodrigo, J., & Herrero, M. (2011). Stamen development and winter dormancy in apricot (*Prunus armeniaca*). *Annals of Botany*, 108(4), 617–625.
- Konzmann, S., Koethe, S., & Lunau, K. (2019). Pollen grain morphology is not exclusively responsible for pollen collectability in bumble bees. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8.
- Kostrycy, M., & Chwil, M. (2021). Structure of anther epidermis and endothecium, production of pollen, and content of selected nutrients in pollen grains from six *Rubus idaeus* L. cultivars. *Agronomy*, 11(9), 1–44.
- Kostrycy, M., Chwil, M., & Matraszek-Gawron, R. (2020). Comparison of the micromorphology and ultrastructure of pollen grains of selected *Rubus idaeus* L. cultivars grown in commercial plantation. *Plants*, 9(9), 1–31.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., & Angulo, Y. (2017). Biofabrication of copper oxide nanoparticles using Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) fruit and leaf. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21 (Supplement 1), 475–480.
- Lechowicz, K., Bocianowski, J., & Wrońska-Pilarek, D. (2021). Pollen morphology and variability of species from the genus *Rubus* L. (Rosaceae) alien and invasive in Poland. *Journal of Plant Taxonomy and Geography*, 76(1), 109–121.
- Lechowicz, K., Bocianowski, J., & Wrońska-Pilarsk, D. (2022). Pollen morphological Inter- and intraspecific variability in selected species of *Rubus* L. (Rosaceae). *Forests*, 13(11), 1–26.
- Lechowicz, K., Wrońska-Pilarek, D., Bocianowski, J., & Maliński, T. (2020). Pollen morphology of Polish species from the genus *Rubus* L. (Rosaceae) and its systematic importance. *Plos one*, 15(5), 1–23.
- López, G. A. M., Marulanda, A. M. L., Gómez, L. L. M., & Barrera S. C. F. (2019). *Rubus glaucus* Benth.: morphology and floral biology aimed at plant breeding processes. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 8909–8915.
- Lu, L. T., & Bouford, D. E. (2003). *Rubus*. En: Wu, Z. Y., Raven P. H. & Hong, D. Y. (Eds) *Flora of China*, vol. 9 (pp 195–285). Science Press.
- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8616–8624.
- Monasterio-Huelin, E., & Pardo, C. (1995). Pollen morphology and wall stratification in *Rubus* L. (Rosaceae) in the Iberian Peninsula. *Grana*, 34, 229–236.
- Ontivero, M. R., Radice, S., Giordani, E., & Bellini, E. (2005). Preliminary studies on microsporogenesis in *Prunus salicina* Lindl. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(5), 599–604.
- Osorio, C., Hurtado, N., Dawid, C., Hofmann, T., Heredia-Mira, F. J., & Morales, A. L. (2012). Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chemistry*, 132(4), 1915–1921.
- Pacini, E. (2010). Relationships between tapetum, loculus, and pollen during development. *International Journal of Plant Sciences*, 171(1), 1–11.

- Pacini, E., & Dolferus, R. (2019). Pollen developmental arrest: maintaining pollen fertility in a world with a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 10(679), 1–15.
- Pacini, E., & Hesse, M. (2005). Pollenkitt: its composition, forms and functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(5), 399–415.
- Pacini, E., & Hesse, M. (2012). Uncommon pollen walls: reasons and consequences. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich*, 148, 291–306.
- Padilla, F., Soria, N., Oleas, A., Rueda, D., Manjunatha, B., Kundapur, R. R., Maddela, N. R., & Rajeswari, B. (2017). The effects of pesticides on morphology, viability, and germination of Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) and Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) pollen grains. *Biotech*, 7, 1–12.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., Kerr, M., Robertson, K. R., Arsenault, M., Dickinson, T. A., & Campbell, C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant systematics and evolution*, 266, 5–43.
- Punt, W., Hoen, P. P., Blackmore, S., Nilsson, S., & Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143(1-2), 1–83.
- Radice, S., & Galati, B. (2006). Development of pollen grains in Forastero peach cultivar (*Prunus persica* Batsch). *Advances in Horticultural Science*, 20(4), 275–280.
- Rahmani, H., Ahmad, M., Sedigheh, A., Fariba, S., & Sedigheh, M. (2012). A study of microsporogenesis and pollen morphology in *Crataegus babakanloui* (Rosaceae). *Advances in Environmental Biology*, 6(11), 2986–2991.
- Ramírez, F. (2023). *Latin American Blackberries Biology: Mora de Castilla (Rubus glaucus Benth.) Vol 1*. Springer Nature.
- Rincón-Barón, E. J., Grisales, E. C., Cuarán, V. L., & Cardona, N. L. (2020). Alteraciones anatómicas e histoquímicas ocasionadas por la oidiosis en hojas de *Hydrangea macrophylla* (Hydrangeaceae). *Revista de Biología Tropical*, 68(3), 959–976.
- Rincón-Barón, E. J., Torres-Rodríguez, G. A., Cuarán, V. L., Carreño-Olejua, R., & Passarelli, L. M. (2023). Microsporogénesis y ultraestructura de los granos de polen en la planta del cacao, *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Revista de Biología Tropical*, 71(1), 1–13.
- Rincón-Barón, E. J., Torres-Rodríguez, G. A., Passarelli, L. M., Zárate, D. A., Cuarán, V. L., & Plata-Arboleda, S. (2021b). Microsporogénesis y micromorfología del polen de la planta *Alcea rosea* (Malvaceae). *Revista de Biología Tropical*, 69(3), 852–864.
- Rincón-Barón, E. J., Zárate, D. A., Castañeda, G. A. A., Cuarán, V. L., & Passarelli, L. M. (2021a). Micro-morfología y ultraestructura de las anteras y los granos de polen en diez genotipos élite de *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Revista de Biología Tropical*, 69(2), 403–421.
- Rosbakh, S., Pacini, E., Nepi, M., & Poschlod, P. (2018). An unexplored side of regeneration niche: seed quantity and quality are determined by the effect of temperature on pollen performance. *Frontiers in Plant Science*, 9, (1036), 1–17.
- Ruggiero, F., & Bedini, G. (2020). Phylogenetic and morphologic survey of orbicules in angiosperms. *Taxon*, 69(3), 543–566.
- Ruzin, S. E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University.
- Samaniego, I., Brito, B., Viera, W., Cabrera, A., Llerena, W., Kannangara, T., Vilcacundo, R., Angós, I., & Carrillo, W. (2020). Influence of the maturity stage on the phytochemical composition and the antioxidant activity of four Andean blackberry cultivars (*Rubus glaucus* Benth) from Ecuador. *Plants*, 9(8), 1–16.
- Song, J. H., Moon, H. K., & Hong, S. P. (2016). Pollen morphology of the tribe Sorbarieae (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 302, 853–869.
- Song, J. H., Oak, M. K., Roh, H. S., & Hong, S. P. (2017). Morphology of pollen and orbicules in the tribe Spiraeae (Rosaceae) and its systematic implications. *Grana*, 56(5), 351–367.
- Soukup, A. (2014). Selected simple methods of plant cell wall histochemistry and staining for light microscopy. En V. Žárský, & F. Cvrčková (Eds.), *Plant cell morphogenesis: methods and protocols, methods in molecular biology* (pp. 25–40). Humana Press.
- Sumner, M. J., & Remphrey, W. R. (2005). Microsporogenesis in *Amelanchier alnifolia*: sporogenous cells, microsporocytes, and tetrads. *Botany*, 83(9), 1106–1116.
- Szalay, L., Timon, B., Szabó, Z., & Papp, J. (2002). Microsporogenesis of peach (*Prunus persica* L. Batsch) varieties. *International Journal of Horticultural Science*, 8(3–4), 7–10.
- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J. A., Berger, J. D., & Nayyar, H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 67(3), 429–443.
- Tomlik-Wyremblewska, A., Van Der Ham, R. W. & Kosinski, P. (2004). Pollen morphology of genus *Rubus* L. Part III. Studies on the Malesian species of subgenera *Chamaebatus* L. and *Idaebatus* L. *Acta societatis botanicorum Poloniae*, 73(3), 207–227.



- Verstraete, B., Moon, H. K., Smets, E., & Huysmans, S. (2014). Orbicules in flowering plants: a phylogenetic perspective on their form and function. *The Botanical Review*, 80(2), 107–134.
- Wang, Y., Chen, Q., Chen, T., Tang, H., Liu, L., & Wang, X. (2016). Phylogenetic insights into Chinese *Rubus* (Rosaceae) from multiple chloroplast and nuclear DNAs. *Frontiers in plant science*, 7, 1–13.
- Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1991). The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. *Australian Systematic Botany*, 4(4), 681–695.
- Weber, H. E. (1996). Former and modern taxonomic treatment of the apomictic *Rubus* complex. *Folia Geobotanica*, 31, 373–380.
- Wrońska-Pilarek, D., Jagodziński, A. M., Maliński, T. (2012). Morphological studies of pollen grains of the Polish endemic species of the genus *Rubus* (Rosaceae) *Biologia*, 67(1), 87–96.
- Xiong, X. H., Zhou, X. M., Li, M., Xu, B., Deng, H. N., Yu, Q., & Gao, X. F. (2019). Pollen morphology in *Rubus* (Rosaceae) and its taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 305, 705–716.
- Ye, Z., Su, M., Li, L., & Zhang, S. (2010). Effects of high temperature on the microsporogenesis and pollen development of peach. *Acta Horticulturae Sinica*, 37(3), 355–362.
- Zini, L. M., Galati, B. G., Zarlavsky, G., & Ferrucci, M. S. (2017). Developmental and ultrastructural characters of the pollen grains and tapetum in species of *Nymphaea* subgenus *Hydrocallis*. *Protoplasma*, 254, 1777–1790.