

Comportamiento meiótico y descripción morfológica del polen de pronto alivio¹

[Aida Myrian Muñoz M.](#),² [Creuci María Caetano](#),³ [Franco A. Vallejo C.](#)⁴ [Manuel S. Sánchez O.](#)⁵

[Compendio](#) | [Abstract](#) | [Introducción](#) | [Materiales y Métodos](#)

[Resultados y Discusión](#) | [Agradecimientos](#) | [Bibliografía](#)

COMPENDIO

Este estudio fue realizado en la Universidad Nacional de Colombia y el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, para evaluar la meiosis se utilizaron las metodologías adaptadas por Dempsey (1993). Se observaron irregularidades tales como ascensión precoz de cromosomas, terminación tardía de quiasmas, adherencia cromosómica, formación de tétradas con microcitos y poliadas que llevaron a desbalances cromosómicos y a la producción de gametos inviables. Se verificó relativa estabilidad meiótica, medida a través del porcentaje de tétradas de microsporas viables o índice meiótico (IM). Aunque el IM fue de 77.3 %, la viabilidad polínica fue 11.4%, lo que sugiere que pudieron actuar genes mutantes en la post-meiosis. El tamaño del polen fue mediano, con 28.0 µm de diámetro ecuatorial y 26.9 µm de eje polar en vista ecuatorial, oblató esferoidal, tipo de área polar, grande y abertura corta, triaperturado, tricolporado, y zonoaperturado, perforado y tectado (microscopía de luz y electrónica de barrido MEB). Ensayos preliminares mostraron baja viabilidad y germinación de semillas.

Palabras claves: *Lippia alba*, Verbenaceae, meiosis, viabilidad polínica, morfología polínica.

ABSTRACT

Meiotic behavior and pollen morphology of *Lippia alba*. This study was carried out in the National University of Colombia UNAL and the International Center of Tropical Agriculture CIAT, to evaluate the meiosis in *L. alba*. The methodologies used were described by Dempsey (1993). Meiotic irregularities were observed such as precocious ascension of chromosomes, delayed ending of quiasmas, chromosome stickiness, tetradas with microcytes and polyads resulting in chromosome imbalance and production of inviable gametes. Meiotic index (MI) measured by the percentage of viable tetradas of microspores was relatively high, indicating a reasonable meiotic stability. Although the MI were of 77.3 %, pollen viability was up to 11.4%, which suggests that mutant genes could work post-meiosis. The size of pollen of *L. alba* was medium, with 28.0 µm of equatorial diameter and 26.9 µm of polar axis in equatorial view, oblate spheroidal, type of polar area is large and short aperture, triaperturate, tricolporate, zonoaperturate, pierced and tectate (optic microscopy and electronic microscopy of scanning EMS). Preliminary test showed very low viability and germination of seed.

Key words: *Lippia alba*, Verbenaceae, meiosis, pollen viability, pollen morphology.

¹ Artículo derivado de lé ACCEPT.: 12-05-06

² Ing. Agr. M.Sc. Unal - Palmira- ammz1010@yahoo.es

³ Ph.D. Profesora asociada Unal - Palmira - cmcaetano@palmira.unal.edu.co

⁴ Ph.D. Profesor Titular Unal - Palmira - favallejoc@palmira.unal.edu.co

⁵ Ing. Agr. M.Sc. Profesor Asociado Unal - Palmira mssanchezo@palmira.unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Lippia alba (Verbenaceae) es una especie aromática de uso generalizado, en Centro y Sur América. En las hojas se detectan esteroides, taninos, flavonoides, saponinas, aminoácidos y sustancias amargas (García, 1975); presenta alta concentración de monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos oxigenados; contiene como componente mayoritario la carvona, seguido del limoneno, el biciclosesquifelandreno, la piperitenona, la piperitona y el B - burboneno (Stashenko, 2003). Se le atribuye actividad antiséptica, astringente, diaforética, emenagoga, espasmolítica, estomáquica, expectorante, febrífuga, pectoral y sudorífica (García, 1975; Cáceres, 1996). También se utiliza en la elaboración de infusiones, comprimidos, cápsulas, aceites esenciales, sales para baños y cremas (Gutiérrez, 2004).

La mayoría de las investigaciones en plantas medicinales se orienta al aprovechamiento del recurso, dejando de lado temas como la reproducción que puede ser limitante al momento de desarrollarse como cultivo comercial. La forma de reproducción predominante en *L. alba* es vegetativa, mediante estacas.

La baja disponibilidad de semilla y las dificultades de manejo y conservación se convierten en inconveniente en la reproducción y multiplicación del material. Los estudios meióticos explican algunos fenómenos reproductivos de la especie, la comprensión de los mecanismos de heredabilidad y de variabilidad genética. La meiosis es una de las fuentes de variabilidad genética utilizada por los organismos para la adaptación al medio ambiente y en consecuencia, la perpetuación a través de la descendencia (Caetano, 2003).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los procesos meióticos que puedan explicar los problemas de reproducción sexual en *L. alba*, además de describir la morfología del polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se realizó en el Centro Experimental de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira CEUNP (3° 24' N y 76° 26' W, municipio de Candelaria, Departamento del Valle del Cauca; 927 m.s.n.m; precipitación promedio anual de 1100 mm; 24.5 °C y humedad relativa promedio diaria de 65%) y en la Unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. Se usaron tres (3) accesiones de *L. alba*, procedentes del Valle del Cauca y Llanos Orientales (Colombia) y Costa Rica (Centro América).

Para evaluar el comportamiento meiótico se emplearon las metodologías adaptadas por Dempsey (1993). Se colectaron inflorescencias inmaduras en varios estados de desarrollo y se fijaron en una solución Farmer 3:1, durante 24 horas, se cambió el fijador y se almacenaron a 4°C. A las anteras se aplicó una gota de acetocarmín al 1% durante tres tiempos (5, 10 ó 15 minutos). Se registró la frecuencia de microsporocitos normales y anormales, así como de tétradas de microsporas o índice meiótico (IM). Se analizaron los diferentes patrones de huso y las respectivas tétradas de microsporas.

Para estudiar la viabilidad del polen se hizo tinción de anteras (provenientes de una o dos flores) con una gota de acetocarmín al 2% durante tres tiempos (5, 10 ó 15 minutos). El índice de viabilidad (%) se determinó mediante el conteo de polen viable y no viable. De cada accesión se montaron cinco placas y en cada una se observaron diez campos.

Para la caracterización del polen, además de observaciones y mediciones en microscopía de luz, se empleó microscopía electrónica de barrido (MEB). Se utilizó el protocolo de deshidratación de muestras empleado en el laboratorio de la Unidad de Virología del CIAT. Se fijó en glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0.1M, pH 7.2. Se realizó la pos-fijación en tetróxido de osmio OsO₄ durante 24 horas y la deshidratación en serie alcohólica (10, 25, 50, 70, 90, 100%) durante 20 minutos. Posteriormente se hizo un proceso de secado de punto crítico. Las muestras se metalizaron con oro paladio con una lámpara de 70 nm de espesor para la observación en microscopio electrónico de barrido. Se caracterizó el polen a partir de las fotografías en MEB y en microscopía de luz. Los caracteres considerados fueron el tipo de agrupación, el NPC (número, posición, carácter o tipo de aberturas), la ornamentación de la esporodermis, la longitud del eje polar P (línea imaginaria que pasa por el centro del grano y atraviesa el centro del polo proximal y el del distal), el diámetro ecuatorial E (línea imaginaria perpendicular al eje polar y que atraviesa el grano por la parte media), el índice del área polar-IAP (indica la relación entre la distancia de dos aberturas adyacentes - LA y el diámetro ecuatorial en vista polar - DEP, LA/DEP), el tamaño (longitud del eje polar) y la forma del polen P/E (cuando el grano de polen se observa en vista ecuatorial). La terminología para describir el grano de polen fue la de Erdtman (1952). En las mediciones se utilizaron cuatro fotografías de las cuales se tomó el promedio para establecer los diferentes rangos e índice.

Se realizaron pruebas de viabilidad de la semilla utilizando tetrazolio al 0.5 y 1.0 %, dejándolas sumergidas durante 24 y 48 horas a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento meiótico

El comportamiento meiótico de *L. alba* se evaluó especialmente en la accesión de Costa Rica. El periodo de tinción con mejores resultados fue 15 minutos. Se presentaron varias anomalías, entre ellas ascensión precoz de cromosomas (Figura 1 a-c, cabeza de flecha), terminación tardía de quiasmas (Figura 1 b) y adherencia cromosómica (Figura 1 c), las dos últimas resultaron en puentes de cromatina (Figuras 1 b-c, flechas punteadas). Los cromosomas en ascensión precoz que no se reintegraron al núcleo principal originaron los micronúcleos y estos los microcitos (Figura 1 d). La Figura 1 d muestra una tétrada con cuatro microsporas y dos microcitos. Solamente una de las microsporas presentó nucleolo, evidenciando el desbalance cromosómico, lo cual conduce posiblemente a la producción de gametos inviables.

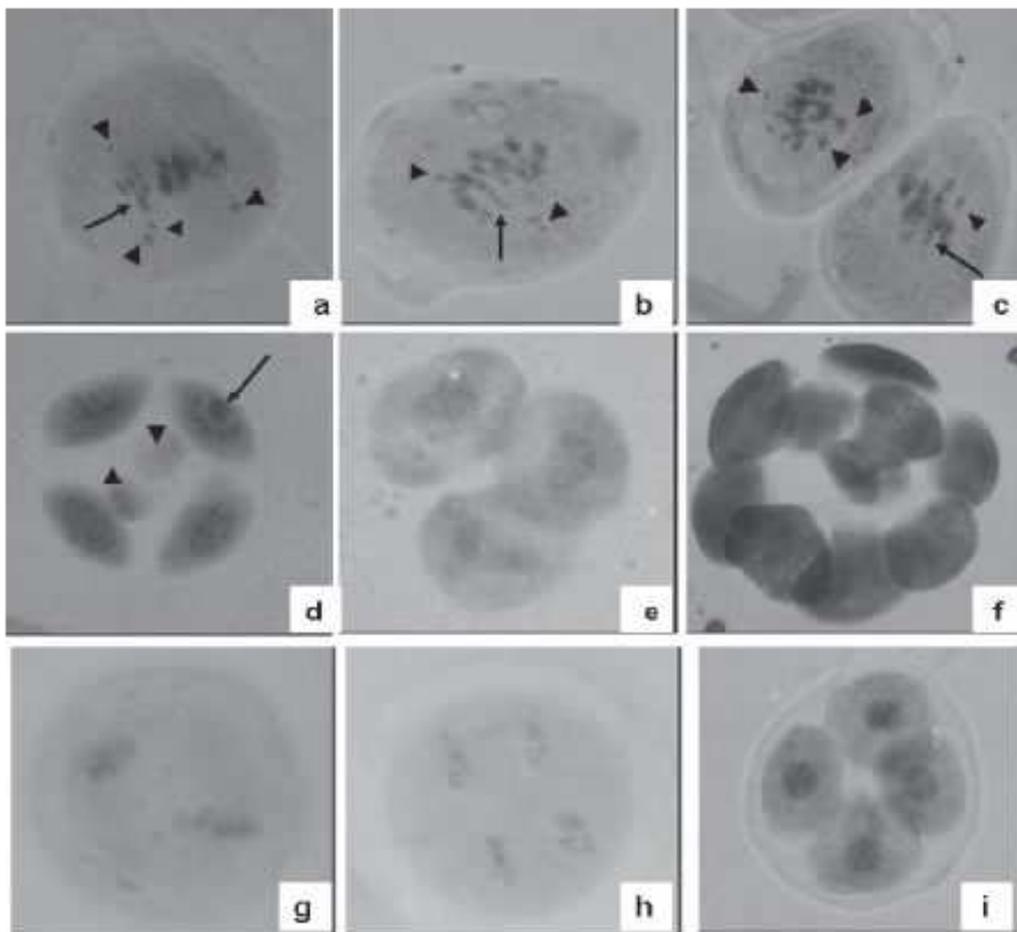


Figura 1. Comportamiento meiótico en *L. alba* accesión Costa Rica. a - c. Ascensión precoz de cromosomas (cabeza de flecha) y pequeños puentes cromosómicos causados por terminación tardía de quiasmas y/o por adherencia cromosómica (flecha). d. Tétrada con cuatro microsporas y dos microcitos (cabeza de flecha) y nucleolo bien visible en solamente una de las microsporas (flecha). e. Triada. f. Poliada. g - i patrones de uso. g. Metafase II Patrón de huso perpendicular. h. Anafase II exhibiendo husos paralelos. i. Tétrada entrecruzada

Además de la segregación precoz, la terminación tardía de los quiasmas y adherencia cromosómica pueden resultar en granos de polen estériles. Esta última se caracteriza por intensa aglomeración de la cromatina a partir del paquiteno, lo que impide la segregación regular de los cromosomas, así los productos meióticos son generalmente anormales (Caetano, 2003). En maíz (Beadle, 1937) y en *Collinsia tinctoria* (Mehra y Rai, 1970), plantas homocigotas para el gene *st* (*sticky*) presentaron esterilidad masculina y femenina.

Otras irregularidades observadas fueron la presencia de díadas, triadas (Figura 1 e) y poliadas presentando de cinco a doce microsporas (Figura 1 f). Las dos primeras probablemente se originaron por fallas en el momento de la división del citoplasma (citocinesis), en meiosis I o II. En condiciones normales se forman cuatro microsporas, lo cual caracteriza el estado de tétradas. Las poliadas se pudieron originar (1) por acción de un gene similar al *dv* (*divergent*) descrito en maíz por Clark, 1940. En este caso los husos en anafase I no convergen hacia los polos y los cromosomas se dispersan a lo largo del meiocito; cada cromosoma o conjunto de cromosomas induce a citocinesis adicional, formando poliadas (Caetano, 2003); (2) por divisiones adicionales de las microsporas en la post-meiosis, sin que haya ocurrido la replicación del ADN, antes de su liberación de la pared de calosis. Mecanismo semejante se ha descrito en maíz, causado por el gene *po* (*polymitotic*), que provoca mitosis supranumerarias durante la formación de polen. La meiosis es normal, pero las microsporas sufren mínimo cuatro divisiones sin replicación (Caetano y Pagliarini, 1997). En cualquiera de los casos los gametos resultantes serán inviables. En *L. alba* se han evidenciado, en meiosis II, distintos patrones de husos (perpendiculares, paralelos y convergentes), los cuales dan lugar a diferentes arreglos de tétradas de microsporas (entrecruzadas, isobilaterales y tetraédricas).

En la Figura 1 g-i, se detallan algunos patrones: metafase II con husos perpendiculares (Figura 1 g), que origina una tétrada entrecruzada (1 i); anafase II con husos paralelos (Figura 2 h), que originará una tétrada isobilateral.

Las clases tetraédrica, isobilateral y entrecruzada, en su orden, fueron las formas usuales. Los arreglos romboidales y lineales fueron excepciones. Como regla general cada especie presenta un arreglo típico y único de tétradas de microsporas, sugiriendo un control genético para esta característica. En *L. alba* los arreglos más comunes han sido el tetraédrico y entrecruzado, el primero considerado más estable o más primitivo (Stebbins, 1950).

Viabilidad del polen

La viabilidad del polen se relaciona directamente con la normalidad de la microsporogénesis (comprendiendo la pre-meiosis, la meiosis y la post-meiosis). Así, aunque la frecuencia de anomalías durante el proceso meiótico fue baja en las tres accesiones, el número de polen inviable fue alto, sin presentar diferencias significativas entre las mismas. La accesión Llanos presentó la menor viabilidad, seguida por Costa Rica y Valle (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de viabilidad polínica en tres accesiones de *L. alba*.

Accesión	Granos viables	Granos inviables	Viabilidad del polen (%)
Costa Rica	95	735	11.4
Valle	181	827	18.0
Llanos	92	735	11.1

En la [Figura 2](#) se detalla el polen de *L. alba* accesión Costa Rica en diferentes estados de maduración. En a y b se observan las microsporas recién liberadas de la pared de calosis, están teñidos, por tanto, viables. En c, dos granos de polen viables (cabeza de flecha) y dos inviables (flecha), por tanto sin tinción. En d y e se muestran dos granos de polen con el contenido completamente degenerado. En esta misma accesión el índice meiótico (IM) fue de 77.3%, contra una viabilidad de polen de 11.4%. Esto sugiere que, además de las irregularidades meióticas, un evento post-meiótico estaría causando degeneramiento de la cromatina.

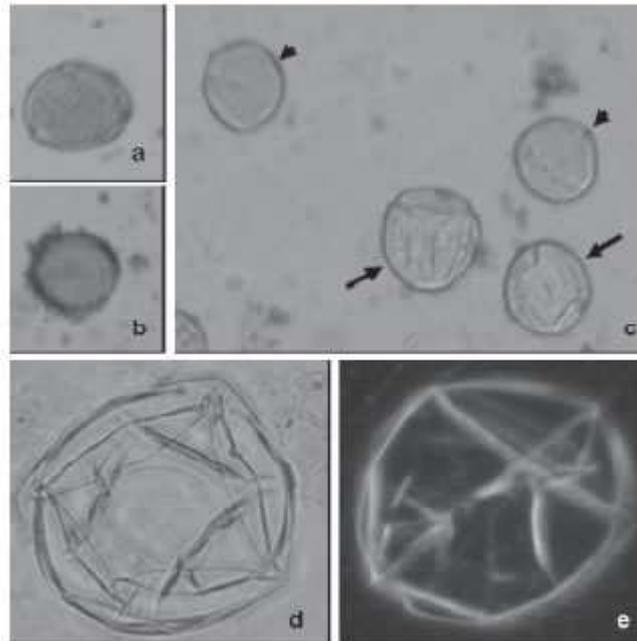


Figura 2. a. y b. Microsporas viables en maduración. c. Granos de polen no viables (flecha) y dos viables (cabeza de flecha). d. y e. Polen con el material cromatinico totalmente degenerado en microscopia de contraste de fase.

Considerando un índice meiótico de 77.3%, los 22.7% de tétradas anormales (tétradas con microcitos, díadas, triadas, poliadas) por sí solos no explican la reducción de la viabilidad polínica al nivel de 11.4%. Por tanto, la baja viabilidad encontrada en los granos de polen de *L. alba* se puede deber a la acción de algún gen ms que se expresa principalmente en la post-meiosis, degenerando el material genético (Singh, 2003).

Caracterización y descripción del polen

La caracterización del polen se realizó en especial en las accesiones Llanos y Costa Rica. El periodo de tinción con mejores resultados fue 15 minutos. Los granos presentaron tres aberturas, según la posición fueron zonoaperturados (aberturas localizadas en la región ecuatorial o subecuatorial o en dos o más zonas paralelas al ecuador). De acuerdo con el carácter fueron "colporos" o sea que están formadas por colpo y poro (abertura compuesta); el colpo (abertura larga, en forma de bote con extremos agudos, sin ramificaciones, dos veces más larga que ancha) actúa como abertura harmomégata y el poro como abertura central (Figura 3). El polen de *L. alba* es entonces tricolporado, triaperturado y zonoaperturado, lo que coincide con Peralta (2003), quien afirma que el polen en la mayoría de las especies de la familia Verbenaceae es tricolporado.



Figura 3. a. Grano de polen de la accession Costa Rica en vista polar mostrando las tres aberturas, triaperturado. b. Grano de polen mostrando el tipo de abertura "compuesta", colpo (abertura alargada) y un poro (en la parte central), por tanto colporo. c. exina con ornamentación de tipo perforado. Las flechas muestran las perforaciones en la superficie del polen.

De acuerdo con el tipo de ornamentación el polen fue perforado o tectado (Figura 3). La evolución de la estructura y ornamentación de la esporodermis está relacionada con adaptaciones para la polinización, por ejemplo, las plantas con polinización anemófila generalmente presentan granos de polen psilados, secos y pequeños; las plantas con polinización entomófila presentan granos de polen con exina ornamentada (Fonnegra, 1989). *L. alba* presentó granos de polen separados y simples (monadas); isopolares y de simetría radial. De acuerdo con la polaridad, el polen es tridimensional, elipsoide. En Angiospermas el tamaño del polen varía desde 2 μm en *Myosotis* (Boraginaceae) a más de 300 μm en *Cymbopetalum* (Annonaceae) (Fonnegra, 1989).

De acuerdo con el eje polar, el tamaño de *L. alba* se ubicó en la categoría mediano (Erdtman, 1952). Según Vit *et al.* (2002), quienes analizaron el polen de *L. alba* con finalidad apícola, éste mide aproximadamente 30 μm de diámetro. De acuerdo con el IAP, el área polar es grande y la abertura corta (Tabla 2).

Tabla 2. Variables morfométricas del polen de *L. alba*

Variable	Medida (μm)
Diámetro ecuatorial (E)	28.00
Eje polar (P)	26.90
Lado de apocolpo o apoporo (LA)	15.50
Diámetro ecuatorial en vista polar (DEP)	23.40
Índice de área polar (IAP : LA /DEP)	0.66
Índice de forma (P/E)	0.96

La forma del polen es oblato esferoidal, por cuanto la relación P/E dio como resultado un intervalo entre 0.95 y 0.97, coincidiendo con el informe de Vit *et al* (2002). Los granos de polen en la familia Verbenaceae son oblatos, suboblatos, esferoidales, prolatos, en su mayoría (Peralta, 2003). Hubo leves diferencias en tamaño y forma del polen, sin embargo, el rango de variación es propio de la especie.

Las pruebas preliminares de germinación no fueron exitosas, al no formarse plántulas en ninguna de las tres accesiones. La viabilidad de la semilla fue de alrededor de 8% (Figura 4). Los problemas de reproducción sexual de *L. alba* pueden estar relacionados con las anomalías y la baja viabilidad polínica encontradas.

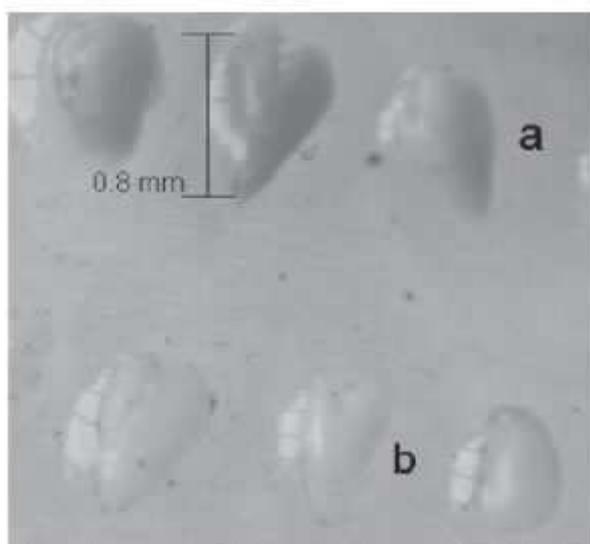


Figura 4. a. Semillas teñidas y b. Semillas no teñidas de *L. alba*

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Investigación "Recursos genéticos de plantas medicinales, aromáticas y condimentarias; colección, evaluación, producción y poscosecha" por la financiación de la tesis (Proyectos Colciencias: 1120-07-12489, 1120-07-14931).

Al Programa de Investigación "Mejoramiento genético, agronomía y producción de semillas de hortalizas", por su colaboración.

A la doctora Creuci Maria Caetano por compartir su experiencia y conocimientos en la realización del presente trabajo.

Al doctor Franco A. Vallejo C. por su asesoría y colaboración.

A los profesores Manuel S. Sánchez O. y Carmen R. Bonilla por su asesoría.

A la investigadora Martha L. Escandón por la colaboración prestada.

BIBLIOGRAFÍA

- Beadle, G. W. 1937. Chromosome aberration and gene mutation in sticky chromosome plants of *Zea mays*. *Cytologia* (Fujii jubilee vol) 43 - 56.
- Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria. 305 - 307.
- Caetano P., C.M.; Pagliarini, M.S. 1997. Cytomixis in maize microsporocytes. *Cytologia*. 62: 351 - 355.
- Caetano P., C.M. 2003. La aplicabilidad de la citogenética en *Zea mays* L.: genes mutantes meióticos. *Rev Ciencias Agríc* (Universidad de Nariño) 20: 27 - 49.
- Clark, F.L. 1940. Cytogenetic studies of divergent meiotic spindle formation in *Zea mays*. *Am J Bot* 27: 547 - 559.
- Dempsey, E. 1993. Traditional analysis of maize pachytene chromosomes. *In*: Freeling, M; Walbot, V. (eds.) *The Maize Handbook*. New York: Springer- Verlag 432 - 441.
- Erdtman, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy angiosperms. *Chronica Botanica Co.*, Waltham, Mass., United States. First published. 539p.
- Fonnegra, R. 1989. Introducción a la palinología: Métodos de estudio palinológico. Medellín. Universidad de Antioquia. 120p.
- García B., H. 1975. Plantas Medicinales de Colombia. Bogotá: Imprenta Nacional. p. 506 -507.
- Gutiérrez, M. A., 2004. El mercado potencial de ocho plantas medicinales latinoamericanas *En*: Segundo Seminario Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas y Foro sobre Mercado, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 16 - 17 de septiembre, 2004. Memorias.
- Mehra, R.C.; Rai K.S. 1970. Cytogenetic studies of meiotic abnormalities en *Collinsia tinctoria*. I. Chromosomal stichiness. *Can J Genet Cytol* 12: 560 - 569.
- Peralta, G., S. 2003. Morfología de polen de Verbenaceae de Guerrero, México. Facultad de Ciencias, UNAM. 145.
- Singh, J. R. 2003. Plant Cytogenetics. Florida, United States. CRC Press. 463p.
- Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E. Martinez, J. R. 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev Acad Col Cienc Exact Fis Nat* Vol. 27 (105): 579 - 597.
- Stebbins, G.L., 1950. Variation and Evolution in Plants. New York: Columbia University Press. 133
- Vit, P.; Silva, B.; Meléndez ,P. 2002. *Lippia alba* N.E. Br. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 2 Cidrón. *Rev Fac Farm Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela*. Vol. 43.
-