

<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop.v71i1.51101>

Microsporogénesis y ultraestructura de los granos de polen en la planta del cacao, *Theobroma cacao* (Malvaceae)

Edgar Javier Rincón-Barón^{1*};  <https://orcid.org/0000-0003-1347-171X>
Gerardo Andrés Torres-Rodríguez²;  <https://orcid.org/0000-0003-2381-2936>
Viviana Lucia Cuarán³;  <https://orcid.org/0000-0001-7295-0046>
René Carreño-Olejua³;  <https://orcid.org/0000-0001-8818-565X>
Lilian M. Passarelli⁴;  <https://orcid.org/0000-0002-8870-8622>

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

Recibido 24-V-2022. Corregido 07-XI-2022. Aceptado 23-II-2023.

ABSTRACT

Microsporogenesis and ultrastructure of pollen grains in the cocoa plant, *Theobroma cacao* (Malvaceae)

Introduction: We know of no studies on the microsporogenesis of the cocoa plant, and little is known about the ultrastructure of its pollen grains.

Objective: To describe microsporogenesis and ultrastructure of pollen grains in *T. cacao*.

Methods: We processed over 30 flowers for each floral stage and stained with Safranin-Alcian Blue, PAS-Amidoblack and Lacmoid. For transmission microscopy we processed samples on resin and stained with toluidine blue. For scanning electron microscopy, we fixed and dehydrated in 2.2-dimethoxypropane, critically dried and coated with gold.

Results: Anthers differentiated by a cellular mass at the ends distal to the staminal filaments. During development, the anther wall has several cellular layers reduced, at maturity, to the epidermis and endothecium. Microspore mother cells divide by meiosis to form tetrads. The tapetum is secretory and intact until the grains are released, to later degenerate. Pollen grains are isopolar, spheroidal, small, tricolpate. Ultrastructure has a semi-TECTATE sporodermis, with reticulate ornamentation, and heterobrochated reticulum with the muri without ornamentation. Exine is deposited before intine. The orbicules are individual, smooth, and varied in size. There is abundant pollenkit on the tectum and between the columellae. The intine is thin, but develops widely in the colpus areas, forming a compact internal intine and an unusual external intine with a columellated appearance.

Conclusion: Anther structure and development follows the angiosperm pattern. Simultaneous microsporogenesis and centripetal deposition of the sporodermis are known from Malvaceae, but intine characters are novel for the family.

Key words: cocoa; Malvaceae; microspore; palynology; pollen ontogeny; sporodermis; tapetum.



RESUMEN

Introducción: No conocemos estudios sobre la microsporogénesis de la planta de cacao, y poco se sabe sobre la ultraestructura de sus granos de polen.

Objetivo: Describir la microsporogénesis y ultraestructura de los granos de polen en *T. cacao*.

Métodos: Procesamos más de 30 flores para cada etapa floral, teñidas con Safranina-Azul Alcian, PAS-Amidoblack y Lacmoid. Para la microscopía de transmisión procesamos las muestras en resina y las teñimos con azul de toluidina. Para microscopía electrónica de barrido, fijamos y deshidratamos en 2.2-dimetoxipropano, secamos hasta un punto crítico y recubrimos con oro.

Resultados: Anteras diferenciadas por una masa celular en los extremos distales a los filamentos estaminales. Durante el desarrollo la pared de las anteras presenta varios estratos celulares y al madurar se reducen a la epidermis y al endotecio. Las células madre de microsporas se dividen por meiosis para formar tétradas. El tapete es secretor e intacto hasta que se liberan los granos, para luego degenerar. Los granos de polen son isopolares, esféricos, pequeños, tricolpados. La ultraestructura presenta una esporodermis semitectada, con ornamentación reticulada, y un retículo heterobrochado con el muri sin ornamentación. La exina se deposita antes que la intina. Los orbículos son individuales, lisos y de tamaño variado. Hay abundante polenkit en el tectum y entre las columelas. La intina es delgada, pero se desarrolla ampliamente en las áreas del colpo, formando una intina interna compacta y una intina externa inusual con una apariencia columelada.

Conclusión: La estructura y el desarrollo de las anteras siguen el patrón de las angiospermas. La microsporogénesis simultánea y la deposición centripeta de la esporodermis se conocen de Malvaceae, pero los caracteres de la intina son nuevos para la familia.

Palabras clave: cacao; esporodermis; Malvaceae; microspora; ontogenia del polen; palinología; tapete.

INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L. es una planta ampliamente cultivada y distribuida en las zonas tropicales del mundo. Actualmente se encuentra en la familia Malvaceae (Bayer et al., 1999; Bayer & Kubitzki, 2003; Bhattacharjee, 2018; Richardson et al., 2015) y circunscrita a la subfamilia Byttnerioidea (Bayer et al., 1999; Bayer & Kubitzki, 2003). *T. cacao* es un cultivo tropical de importancia económica dado que los cotiledones de sus semillas son la materia prima para la industria de chocolates, la producción de manteca y cacao en polvo; las cuales son industrias multimillonarias que consumen el grueso de la producción mundial (Squicciarini & Swinnen, 2016; Wickramasuriya & Dunwell, 2018).

A pesar de la importancia económica de *T. cacao*, son escasos los trabajos relacionados con la comprensión de su biología reproductiva; algunos de estos tienen en cuenta el desarrollo y la morfología floral, viabilidad del polen, polinizadores y mecanismos de compatibilidad (Bayer & Kubitzki, 2003; Bridgeman et al., 2017; de Jesus-Branco, et al., 2018; Ford & Wilkinson, 2012; Lanaud et al., 2017; López et

al., 2018; Narayanapur et al., 2018; N'Zi, et al., 2017; Rangel et al., 2012; Rincón-Barón et al., 2021a; Swanson et al., 2008). Si bien es cierto que se han hecho esfuerzos en la descripción de la microsporogénesis en algunas Malvaceae (Galati & Rosenfeldt, 1998; Lattar et al., 2012; Lattar et al., 2014; Rincón-Barón et al., 2021a; Tang et al., 2006; Tang et al., 2009) en *T. cacao* es poco lo que se conoce y la mayoría de los estudios solo documentan brevemente algunos aspectos de este proceso, por lo cual los eventos que marcan la formación de los granos de polen en esta especie permanecen aún sin resolver (Rincón-Barón et al., 2021b; Sivachandran et al., 2017). Es importante indicar que conocer y entender los procesos de microsporogénesis en plantas ayudan en la comprensión de los procesos evolutivos y relaciones filogenéticas de este grupo de organismos (Furness et al., 2002; Nadot et al., 2008). Así mismo, es importante conocer a cabalidad la biología reproductiva de plantas como *T. cacao* dada su importancia económica que la ha llevado a convertirse en el sustento económico de muchas familias en las regiones tropicales (Abbott et al., 2018; Antolínez et al., 2020; Beg et al., 2017; Osorio et al., 2017; Sánchez et al., 2019; Squicciarini

& Swinnen, 2016; Wickramasuriya & Dunwell, 2018). Atendiendo a estas razones, en este trabajo de investigación se realiza una descripción pormenorizada de los mecanismos ontogenéticos de la formación de los granos de polen de *T. cacao*, haciendo énfasis en la arquitectura y morfología de las células arquesporiales, 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, micromorfología y ultraestructura de los granos de polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron más de 30 flores por cada etapa del desarrollo floral empleando el genotipo CCN 51 (Colección Castro-Naranjal) por ser ampliamente cultivado. Las muestras fueron obtenidas del banco de germoplasma *ex situ* del Centro de Investigaciones La Suiza de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) ubicado en el Municipio de Rionegro, Santander-Colombia a 540 m de altitud (7°22'12" N & 73°11'39" W) durante los meses de junio-julio del 2021. 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 (McCormick®) durante 12 horas a 55 °C. Se obtuvieron secciones transversales y longitudinales con micrótopo rotatorio LEICA RM® 2125, entre 4-5 µm de grosor. Se procedió a la tinción de las muestras con Safranina-azul de Alcian para distinguir estructuras con paredes primarias y secundarias y de manera no específica presencia de polifenoles totales. 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 a literatura especializada (Demarco, 2017; Ramming et al., 1973; Rincón-Barón et al., 2020; Rincón-Barón et al., 2021a; 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 postfijarlas 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 gradual 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 Ultramicrótopo 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 y de manera no específica polifenoles totales (Rincón-Barón et al., 2020; Rincón-Barón et al., 2021a). Tanto las secciones en parafina como las de resina se examinaron con un microscopio fotónico Nikon eclipse Ni equipado con el sistema de contraste diferencial de interferencia (CDI). Muestras de las anteras maduras procesadas en parafina y teñidas con Safranina Azul de Alcian fueron examinadas 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). 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 descrito anteriormente se hicieron secciones



ultrafinas de 70 a 90 nm de grosor con cuchilla de diamante para microscopía electrónica de transmisión (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 min y 5 min respectivamente y se observaron con un microscopio de transmisión JEOL JEM 1200EX.

Para llevar a cabo las descripciones morfológicas de los granos de polen con microscopía electrónica de barrido (MEB), se tomaron las anteras de la colección de germoplasma, las cuales 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 procedió a desecar al punto crítico con un desecador SAMDRI®-795. Las muestras se montaron sobre cinta conductiva de carbono de doble cara y se recubrieron con oro en una ionizadora DENTON VACUUM DESK IV durante 10 minutos. Las observaciones y registro fotográfico se realizaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LV. Para las descripciones en general se utilizaron los términos *sensu* Halbritter et al. (2018), Punt et al. (2007) y Crang et al. (2018). Las medidas de los granos de polen maduros están representadas por la medida mínima, media y medida máxima utilizando un $N = 30$.

RESULTADOS

En *T. cacao* se lograron diferenciar siete estadios del desarrollo floral que se correlacionan perfectamente con los principales eventos del proceso de microsporogénesis (Fig. 1A). Las secciones del estadio más inmaduro estudiado revelan la presencia y formación de filamentos estaminales en cuyo extremo se aprecia una masa celular diferenciada, constituida por el tejido arqueosporico, formado por células con abundante citoplasma de aspecto vacuolado y granular, un núcleo voluminoso en posición central y en éste se puede apreciar por lo general un nucleolo (Fig. 1B). A partir de esta masa de tejido arqueosporico también se

formará la pared de las anteras que para este momento del desarrollo floral está constituida por una capa de varios estratos celulares (Fig. 1B). Las capas celulares más internas que delimitan al tejido arqueosporico son de contorno entre cuadrado a rectangular, con la presencia de una vacuola que ocupa la mayor parte del citoplasma y un núcleo en posición excéntrica en el cual se aprecia un nucléolo (Fig. 1B). El siguiente estrato celular de esta pared está formado por una capa de dos o tres células de grosor, muy similares en sus características citológicas a las células anteriormente descritas, pero con contorno más aplanado (Fig. 1B). La capa más externa de células epidérmicas que recubre el primordio de la antera posee contorno cuadrado, con una vacuola grande que ocupa la mayor parte del citoplasma y un núcleo en posición excéntrica; en esta capa es posible observar abundante acumulación de polifenoles almacenados principalmente en el citoplasma (Fig. 1B). A medida que las anteras crecen y se desarrollan a partir del tejido arqueosporico se forman las células madre de las microsporas, y las paredes de las anteras se encuentran formadas por la capa uniestratificada epidérmica claramente diferenciada con abundantes polifenoles y una capa interna de dos o tres estratos celulares parietales de contorno cuadrado a rectangular (Fig. 1C); a partir de este estrato de células más interna se diferenciará el tapete. Las células madre de las microsporas se encuentran densamente empaquetadas en el lóculo microsporangial (Fig. 1C); estas células son de contorno globoso con una pared gruesa y el citoplasma se aprecia granular. Después de experimentar citocinesis meiótica simultánea las células madre de las microsporas forman tétrades de microsporas en disposición tetraédrica (Fig. 1D, Fig. 1E). Estas células se caracterizan por su contorno ovalado con un núcleo voluminoso en posición central, con uno o dos nucleolos y citoplasma de aspecto vacuolado y granular (Fig. 1E). Las microsporas en la tétrade están cubiertas por una gruesa capa de calosa que se aprecia en color azul claro al teñir con Lacmoid (Fig. 1D). Así mismo, para este momento del desarrollo

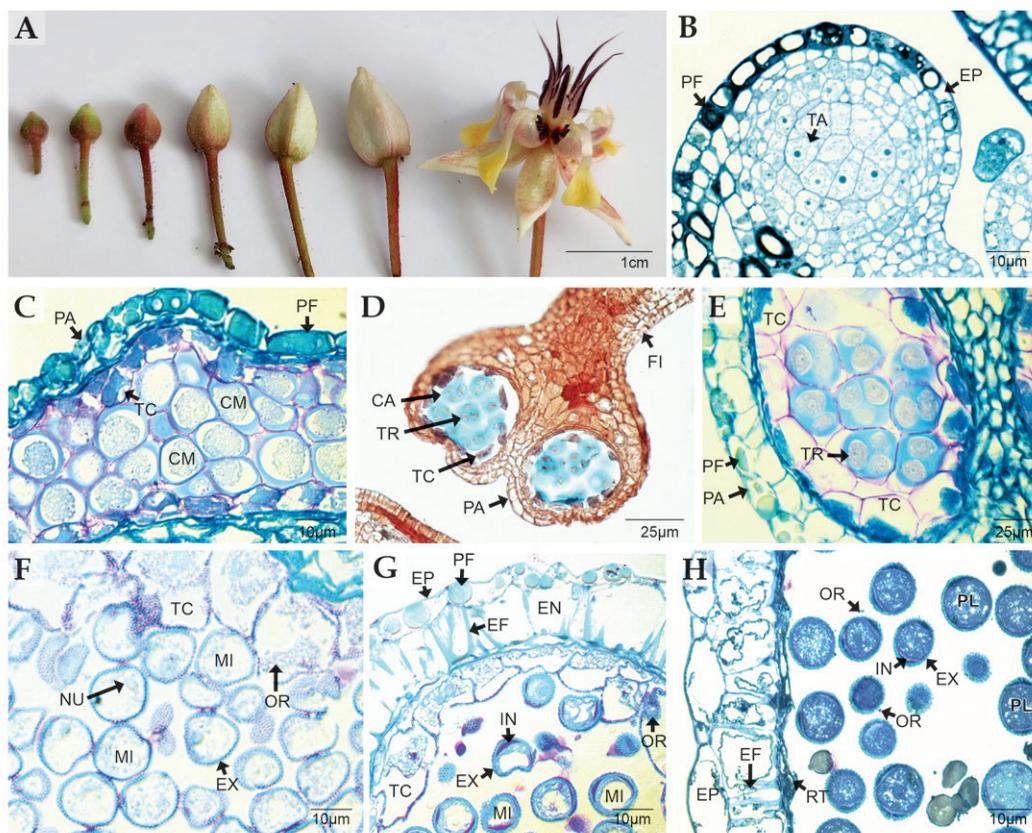


Fig. 1. Microsporogénesis de *Theobroma cacao*. **A.** Estadios del desarrollo floral. **B.** Región apical del filamento estaminal. Se aprecia el tejido arquespórico que formará a las células madre de las microsporas (TBO). **C.** Anteras diferenciadas. Se detallan las células madre de las microsporas (TBO). **D.** Tétrades tetraédricas de microsporas. Se aprecia el tapete celular y calosa alrededor de las microsporas y de las tétrades (Lacmoid) **E.** Detalles de las tétrades tetraédricas de microsporas, pared de la antera y tapete secretor (TBO). **F-G.** Microsporas en maduración (TBO). En **F.** se aprecia la exina y el tapete secretor con abundantes orbículas. En **G.** se distinguen la exina, la intina, el tapete secretor y en la pared de la antera la epidermis y el endotecio. **H.** Antera y granos de polen maduros. Se aprecian restos o remanentes del tapete. CA: calosa; CM: células madre de las microsporas; EF: engrosamientos fibrilares; EN: endotecio; EP: epidermis; EX: exina; FI: filamento estaminal; IN: intina; MI: microsporas; NU: núcleo de la microspora; OR: orbículas; PA: pared de la antera; PF: polifenoles; PL: polen; RT: restos de las células del tapete; TA: tejido arquespórico; TC: tapete secretor; TR: tétrades polínicas tetraédricas. / **Fig. 1.** *Theobroma cacao* microsporogenesis. **A.** Stages of floral development. **B.** Apical region of staminal filament. The archesporic tissue that will form the mother cells of the microspores can be seen (TBO). **C.** Differentiated anthers. Microspore mother cells (TBO) are detailed. **D.** Tetrahedral tetrads of microspores. The secretory tapetum and callose around the microspores in the tetrads (Lacmoid) are appreciated. **E.** Details of the microspore tetrahedral tetrads, anther wall, and secretory tapetum (TBO). **F-G.** Mature microspores (TBO). In **F.**, the exine and the secretory tapetum with abundant orbicules can be seen. In **G.** the exine, the intine, the secretory tapetum, the epidermis and the endothecium are distinguished. **H.** Anther and mature pollen grains. Remnants of the cell tapetum can be seen. CA: callose; CM: Microspore mother cells; EF: fibrillar thickenings; EN: endothecium; EP: epidermis; EX: exine; FI: staminal filament; IN: intine; MI: microspores; NU: microspore nucleus; OR: orbicules; PA: anther wall; PF: polyphenols; PL: pollen; RT: remnants of the tapetal cells; TA: archesporic tissue; TC: secretory tapetum; TR: tetrahedral pollen tetrads.

floral en la pared de las anteras se aprecia el estrato epidérmico, una capa celular inmediatamente yuxtapuesta interna de contorno entre cuadrado y rectangular que se diferenciará

posteriormente en el endotecio, una capa de células aplanadas que delimita internamente con el tapete secretor que a su vez está formado por una capa uniestratificada de células de

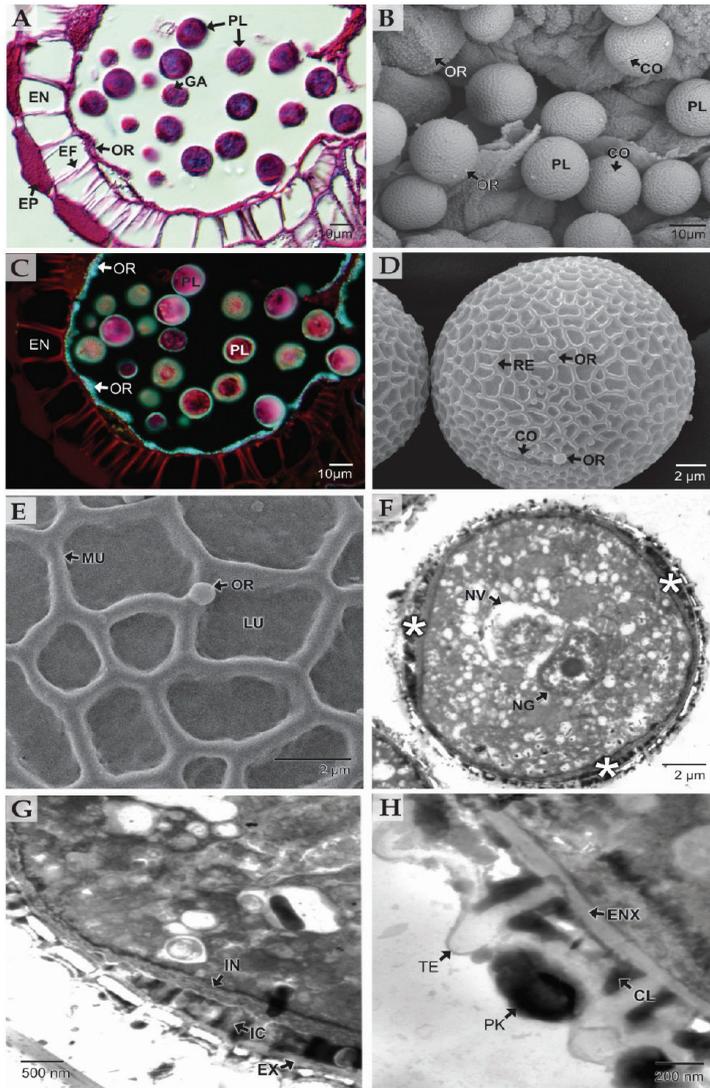


Fig. 2. Detalles morfológicos y ultraestructura de los granos de polen de *Theobroma cacao*. **A.** Sección trasversal de las anteras. Se aprecian las orbículas cubriendo la cavidad de los lóculos microsporangiales y abundantes gránulos de almidón en el citoplasma del polen (PAS-Amidoblack). **B.** Granos de polen y orbículas en las anteras (MEB). **C.** Sección trasversal de las anteras. Se aprecian las orbículas cubriendo la cavidad de los lóculos microsporangiales (Filtro DAPI-FITC-Texas, PAS-Amidoblack). **D-E.** Granos de polen observados con MEB. En **D**, vista subecuatorial. Se aprecian los colpos y las orbículas. En **E**, detalle del retículo con sus muros y lúmenes, se detallan las orbículas. **F-H.** Detalles ultraestructurales de los granos de polen con TEM. En **F**, se aprecian las zonas de las aberturas (asteriscos) y los núcleos generativo

y vegetativo. En **G**., se detalla la estructura de la esporodermis en la zona interabertural, se observa la presencia de abundante polenkitt. En **H**., se detalla la zona de las aberturas con una intina gruesa compacta y otra intina columelada. CI: columelas; CO: colpos; EF: engrosamientos fibrilares; EN: endotecio; ENX: endexina; EP: epidermis; EX: exina; GA: gránulos de almidón; IC: intina columelada; IN: intina; LU: lumen; MU: muros; NG: núcleo generativo; NV: núcleo vegetativo; OR: orbículas; PF: polifenoles; PK: polenkitt; PL: polen; RE: retículo; TE: tectum. / **Fig. 2.** Morphological details and ultrastructure of *Theobroma cacao* pollen grains. **A.** Anthers cross section. Orbicules covering the microsporangial locules cavities and abundant starch granules in the pollen cytoplasm can be seen (PAS-Amidoblack). **B.** Pollen grains and orbicules in anthers (SEM). **C.** Anthers cross section. Orbicules covering the cavity of the microsporangial locules are seen (DAPI-FITC-Texas Filter, PAS-Amidoblack). **D-E.** Pollen grains under SEM. In **D**., subequatorial view. Colpus and orbicules are appreciated. In **E**., detail of the reticulum with its muri and lumens, the orbicules are notable. **F-H.** Ultrastructural details of pollen grains under TEM. In **F**., the areas of the apertures (asterisks) and the generative and vegetative nuclei can be seen. In **G**., the structure of the sporodermis and the pollen grains in the interapertural zone are detailed, the presence of abundant pollenkit is observable. In **H**., the apertural area is detailed, a thick compact intine and a second columellate intine are observed. CI: columella; CO: colpus; EF: fibrillar thickenings; EN: endothecium; ENX: endexine; EP: epidermis; EX: exine; GA: starch granules; IC: columellate intine; IN: intine; LU: lumen; MU: muri; NG: generative nucleus; NV: vegetative nucleus; OR: orbicules; PF: polyphenols; PK: pollenkit; PL: pollen; RE: reticulum; TE: tectum.

contorno rectangular que limitan internamente con las tétrades de microsporas (Fig. 1E). Las microsporas dentro del lóculo microsporangial forman primero la exina, la cual adquiere un patrón de ornamentación reticulada que se tiñe de azul turquesa con Azul de Toluidina (Fig. 1F), se observa un núcleo por cada microspora y el citoplasma es de aspecto granular. Asociado al tapete secretor, se aprecia una granulación fina que corresponde a las orbículas que comparten las características de tinción de la exina con azul de Toluidina (Fig. 1F). Con la maduración de las microsporas, se forma la intina, la cual se aprecia más engrosada en la zona de las aberturas de las microsporas y se tiñe de color azul oscuro o violeta con la misma tinción (Fig. 1G); en tanto que en la pared de la antera para este momento del desarrollo se aprecian cuatro estratos celulares uniestratificados: la epidermis con abundantes depósitos de polifenoles (Fig. 1F). Debajo de la epidermis, se localiza el endotecio que corresponde a una capa uniestratificada de células cuadradas altas con engrosamientos fibrilares lignificados, posteriormente se observa una capa de células aplanadas y finalmente recubriendo el lóculo del microsporangio el tapete secretor se hace más conspicuo y sus células adquieren un contorno entre rectangular y globoso con abundantes orbículas (Fig. 1F, Fig. 1 G). Para el momento de la liberación de los granos de polen la exina e intina han completado su formación, y el tapete ha degenerado por completo (Fig. 1H).

Los granos de polen maduros presentan gran cantidad de gránulos de almidón (Fig. 2A) y sobre los restos de las paredes celulares del tapete secretor se observan depósitos masivos de orbículas que recubren toda la pared de los lóculos de los microsporangios (Fig. 2A). Las orbículas o cuerpos de Ubish de *T. cacao* se presentan en la pared de las anteras principalmente sobre los restos del tapete o sobre los granos de polen (Fig. 2B, Fig. 2D). Las orbículas presentan los mismos patrones de fluorescencia que la exina de los granos de polen cuando son observados utilizando la tinción de PAS-Amidoblack y el filtro de triple banda de excitación DAPI-FITC-Texas, estas estructuras

y la pared de los granos de polen se ven de color azul-verdoso (Fig. 2C).

Los granos de polen son liberados en mónades, isopolares, pequeños (16.6) 18 (20.5) μm con amb circular, esferoidales (Fig. 2D), tricolpados con colpos breves de 5 μm , con membrana ornamentada. La estructura de la esporodermis es semitectada, con ornamentación reticulada, retículos heterobrochados, muros sin ornamentación, además el retículo disminuye de tamaño hacia las aberturas reduciendo el tamaño de los lúmenes aunque los muros mantienen el grosor (0.30 μm) (Fig. 2D, Fig. 2E). Los corpúsculos de Ubish son individuales, lisos y de diferentes tamaños (0.3 a 1 μm) (Fig. 2D, Fig. 2E).

Con TEM se observa una ultraestructura semitectada, la ectexina formada por tectum, columelas y capa basal que constituye la ornamentación reticulada y una endexina muy delgada y compacta (Fig. 2G). En el citoplasma se destacan los núcleos vegetativo y generativo, siendo en estadio binuclear la forma en que son liberados los granos de polen (Fig. 2F). El tectum presenta a la altura de algunas columelas una espina de ápice romo (Fig. 2G), en esta zona la ectexina alcanza el mayor espesor, 4.2 μm , entre espinas su espesor es de 2 μm , siendo las columelas simples; se observa además la endexina (Fig. 2G). El cemento polínico o polenkit se presenta en forma abundante sobre el tectum y entre las columelas (Fig. 2H).

La intina muy delgada en la zona interabertural se desarrolla ampliamente en las zonas de los colpos formando dos capas: una intina compacta interna y una intina externa que delimita con la exina de apariencia columelada o con canales electrónicamente densos (Fig. 2H).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describe por primera vez la microsporogénesis en *T. cacao*, se ha destallado el proceso de diferenciación de las anteras, la formación y estructura del tapete secretor y la secuencia centripeta que conlleva a la formación de los granos de polen desde el depósito de la capa más externa de la pared



polínica que corresponde a la exina, hasta la más interna, la intina; así mismo se detalla la ultraestructura de los granos de polen maduros.

En detalle, fue posible observar que en el extremo distal de los filamentos estaminales de *T. cacao* se localiza una masa de tejido arqueospórico que se diferenciará para la formación de las células madre de las microsporas y los tejidos vegetativos que formaran la antera madura que para el momento de la dehiscencia solo persiste la epidermis y el endotecio; todo el patrón histológico observado, es similar en estructura y función al descrito previamente en Malvaceae y en la mayoría de las angiospermas, situación que muestra un amplio grado de uniformidad ontogenética de este proceso en plantas (Fernández et al., 2015; Lattar et al., 2012; Lattar et al., 2014; Rincón-Barón et al., 2021b; Scott et al., 2004; Tang et al., 2006; von Balthazar et al., 2006).

En algunas especies de Malvaceae se ha registrado la presencia de tapete invasivo no sincitial, además del plasmodial (Galati et al., 2007; Galati et al., 2011; Lattar et al., 2014; Rincón-Barón et al., 2021b; Strittmatter et al., 2000; Tang et al., 2009); aunque el tapete secretor es el más común en esta familia (Lattar et al., 2014; Tang et al., 2006) en ambos casos, el tapete degenera en el momento de la liberación de los granos de polen, situación que se pudo apreciar con el tapete secretor en esta investigación para *T. cacao*. Dado el estrecho contacto que se observó entre las células madre de las microsporas y el tapete secretor de *T. cacao*, se apoya la idea de que el tapete estaría facilitando su maduración y que posteriormente contribuye con el desarrollo de las microsporas, así como, proporciona materia prima para la formación de la esporodermis en especial de la exina (Fernández et al., 2015; Furness et al., 2002; Furness & Rudall 2004; Pacini, 2010; Rincón-Barón et al., 2021b).

En el estadio de células madre de las microsporas la pared primaria persiste mientras las conexiones citoplasmáticas permiten sincronizar la división de los microsporocitos y el avance del proceso en las células tapetales (Galati et al., 2007; Heslop-Harrison, 1974).

La actividad metabólica en este momento es notoria por la presencia de diferentes moléculas y podría interpretarse como una etapa necesaria para la formación de calosa (Galati et al., 2007; Heslop-Harrison, 1966). En *T. cacao* 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 triaberturados, lo cual es ampliamente conocido en eudicotiledóneas y se explica por depósitos de calosa y los puntos de contacto de las microsporas en la tétrade (Furness et al., 2002; Furness & Rudall, 2004). No obstante, en algunas especies se ha documentado la presencia de acumulaciones regulares de calosa durante la formación de las tétrades que culmina con la formación de granos de polen pantoporados (Prieu et al., 2019; Rincón-Barón et al., 2021b).

Se verificó que en *T. cacao* el depósito de la esporodermis es centrípeto, lo que implica, que primero se deposita la exina formada principalmente de esporopolenina y posteriormente se forma la intina que está formada por componentes de pared primaria, este patrón de depósito de la esporodermis es coincidente con el descrito habitualmente en plantas (Blackmore et al., 2007; Pacini & Hesse, 2012; Rincón-Barón et al., 2021b).

Adicionalmente, se observó que la exina toma una tinción azul-turquesa por la presencia de esporopolenina cuando se tiñe con TBO, en tanto que la intina se tiñe de color violeta por los componentes de pared primaria, lo cual es congruente con trabajos anteriores que indican la utilidad de esta tinción diferencial para detectar estos compuestos en los granos de polen e incluso en las esporas de plantas (Rincón-Barón et al., 2020; Rincón-Barón et al., 2021a).

En *T. cacao* se pudo evidenciar que en el estadio de microspora, los precursores de esporopolenina que se originan en el tapete se depositan sobre los granos de polen o sobre las paredes del lóculo microsporangial, por lo tanto, las orbículas se forman en el mismo momento que la pared de los granos y estarían

constituidas por esporopolenina dado que presentan las mismas reacciones de tinción y autofluorescencia que la observada para la exina de la esporodermis, lo cual es similar a lo registrado previamente para otras especies e incluso *T. cacao* (Galati et al., 2007; Galati et al., 2011; Rincón-Barón et al., 2021a; Strittmatter & Galati, 2001). Las orbículas son consideradas primitivas por Verstraete et al. (2014) y han sido documentadas en la Familia Malvaceae (Galati & Rosenfeldt, 1998; Lattar et al., 2014; Rincón-Barón et al., 2021a; Strittmatter et al., 2000); su forma es muy variable, sin embargo, predominan las orbículas lisas que no mantienen la forma de la ornamentación de los granos de polen (Ruggiero & Bedini, 2020) algo que se observó también en las orbículas analizadas en *T. cacao* con una superficie lisa a microgranulada.

Durante la microsporogénesis de *T. cacao* se observó también una amplia producción de polifenoles, especialmente en los tejidos vegetativos de las anteras, un compuesto que predomina en especies de ambientes secos y permite resistir estas condiciones medio ambientales (Varela et al., 2016) y que en este caso en particular permitiría mantener la vitalidad de los granos de polen al momento de la liberación de la antera, cuando la deshidratación es severa; o también se podría relacionar como un mecanismo para evitar la herbivoría y el desarrollo de patógenos en especial hongos (Aime & Phillips-Mora, 2005; Aoun, 2017; Lattanzio et al., 2006; Rincón-Barón et al., 2020; Rincón-Barón et al., 2021a). Se ha registrado para *T. cacao* que los polifenoles se acumulan en las vacuolas principalmente de tejidos epidérmicos y parenquimatosos (Alean et al., 2020; García et al., 2014; Rincón-Barón, et al., 2021b) lo cual es congruente con las observaciones anatómicas realizadas en este trabajo.

En cuanto a los caracteres palinológicos, la Familia Malvaceae es euripalínica, presentando amplia diversidad en la morfología del polen principalmente en el tipo y número de aberturas junto a la ornamentación de la ectexina, propiedades que permiten la diferenciación de taxones (Bayer & Kubitzki, 2003; Bibi

et al., 2010; Dias & Ribeiro, 2015; Hamdy & Shams, 2010; Perveen & Qaiser, 2009; Rincón-Barón et al., 2021b). Según el APG et al. (2016) las antiguas Familias Bombacaceae, Sterculiaceae y Tiliaceae quedaron circunscritas al nivel de subfamilia como son Bombacoideae, Sterculioideae y Tilioideae. Malvaceae s.s. fue considerada estenopalínica, con polen habitualmente grande, pantoporado con una estructura suprareticulada, generalmente con espinas que pueden tener la base mamelonada (*Abutilon* spp., *Hibiscus* spp., *Malva* spp.; Christensen, 1986) o equinada sin base ensanchada (*Alcea rosea* L.; Rincón-Barón et al., 2021b). Actualmente *T. cacao* está circunscrito a la Subfamilia Byttnerioideae, Tribu Theobromateae junto a *Glossotemon* Desf., *Guazuma* Mill y *Herrania* Goudot. La morfología palinológica de los géneros de la subfamilia ha sido escasamente documentada y especialmente en *T. cacao* (Rincón-Barón et al., 2021a), por lo general, la atención ha sido puesta en la polinización y reproducción (López et al., 2018; Young et al., 1987).

En general los granos de polen de la subfamilia Byttnerioideae se caracterizan por la presencia de aberturas simples: poros, o compuestas: colporos, y por una ornamentación reticulada o equinada. Los granos son pequeños, reticulados, heterobrochados, colporados en *Glossotemon bruguieri* (Ali, 2020) y en *Guazuma ulmifolia* Lam. (Ali, 2020; Halbritter 2017). Los granos 3-colpados como los estudiados aquí en *T. cacao* son raros, sólo se han observado de acuerdo con la bibliografía consultada en una especie de la Familia Malvaceae, *Ceiba pubiflora*, Subfamilia Bombacoideae (Venancio et al., 2022). La estructura semitectada de la pared, remata en ornamentación supratectal con espinas ubicadas sobre las columnas, carácter frecuente en Malvaceae s.l. Es destacable la presencia en la zona abertural de la intina muy engrosada, con una capa compacta interna y una intina externa con canales. Esta particularidad ha sido mencionada previamente para la familia, en *Waltheria cinerascens* A. St.-Hil., especie que comparte la Subfamilia Byttnerioideae con *T. cacao*, y único taxón del



género *Waltheria* L. con una intina columelada (Dias & Ribeiro, 2015), esta inusual característica de la intina se aprecia en un trabajo posterior también en *Waltheria*, pero los autores no la mencionan (Amaral et al., 2017).

La intina columelada se ha documentado en investigaciones previas en la familia que abarca diferentes especies correspondientes a grupos no emparentados, en *Abutilon hybridum* Voss se destaca una subestructura microfibrilar en la intina de esta especie, considerado sitio de almacenamiento de proteínas y proponiendo la posible vinculación taxonómica del rasgo (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1982).

Al momento de la anthesis el grano de polen maduro se encuentra en estadio dos nuclear, con la célula generativa libre en el citoplasma de la célula vegetativa. Brewbaker (1967) menciona a la Familia Malvaceae representada por *Abutilon*, *Althea*, *Malva* y *Gossypium* como polen dos-nuclear, coincidiendo con las observaciones realizadas aquí que aportan el dato de *T. cacao* por primera vez.

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 (UDES) por el apoyo financiero: Proyecto Fondo Portugal Convenio N° 2035-2 Agrosavia-UDES Valoración integral de los servicios ecosistémicos asociados al proceso de estructuración y recuperación de la conectividad con sistemas agroforestales con cacao, y a la Universidad del Cauca (UNICAU-CA) por su apoyo técnico e infraestructura.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y al Fondo ambiental del Ministerio del Medio Ambiente y Acción Climática de Portugal, en el marco del proyecto “Mejora de la sostenibilidad ambiental mediante implementación de tecnologías en el marco de la estrategia nacional para el cultivo del cacao - ID 1002031”.

REFERENCIAS

- Abbott, P. C., Benjamin, T. J., Burniske, G. R., Croft, M. M., Fenton, M., Kelly, C. R., Lundy, M. M., Rodríguez, C. F., & Wilcox, M. D. (2018). *An analysis of the supply chain of cacao in Colombia*. Purdue University, The International Center for Tropical Agriculture (CIAT).
- Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012–1022.
- Alean, J., Chejne, F., Ramírez, S., Rincón, E., Alzate-Arbelaez, A. F., & Rojano, B. (2020). Proposal of a method to evaluate the in-situ oxidation of polyphenolic during the cocoa drying. *Drying Technology*, 40(3), 559–570.
- Ali, Z. A. A. (2020). Taxonomic study of *Glossostemon bruguieri* Desf. (Malvaceae) in Iraq. *Plant Archives*, 20(2), 926–929.
- Amaral, C. E., Lima, L. C. & Dias, M. (2017). Pollen morphology of *Waltheria* L. (Malvaceae-Byttnerioideae) from Bahia, Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, 31(4), 597–612.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG), 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.
- Antolinez, E. Y., Almanza, P. J., Barona, A. F., Polanco, E., & Serrano, P. A. (2020). Estado actual de la cacao-cultura: una revisión de sus principales limitantes. *Revista Ciencia y Agricultura*, 17(2), 1–11.
- Aoun, M. (2017). Host defense mechanisms during fungal pathogenesis and how these are overcome in susceptible plants: A review. *International Journal of Botany*, 13, 82–102.
- Bayer, C., Fay, M. F., de Bruijn, A. Y., Savolainen, V., Morton, C. M., Kubitzki, K., Alverson, W., & Chase, M. W. (1999). Support for an expanded family concept of

- Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: A combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129(4), 267–303.
- Bayer, C., & Kubitzki, K. (2003). Malvaceae. In K. Kubitzki (Ed.), *The families and genera of vascular plants* (pp. 225–31). Springer-Verlag.
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108–116.
- Bibi, N., Naveed, A., Manzoor, H., & Khan, M. A. (2010). Systematic implications of pollen morphology in the family Malvaceae from North West frontier province, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2205–2214.
- Blackmore, S., Wortley, A. H., Skvarla, J. J., & Rowley, J. R. (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist*, 174(3), 483–498.
- Bhattacharjee, R. (2018). Taxonomy and classification of cacao. In P. Umaharan (Ed.), *Achieving sustainable cultivation of cocoa* (pp. 1–16). Burleigh Dodds Science Publishing.
- Brewbaker, J. (1967). The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *American Journal of Botany*, 54(9), 1069–1083.
- Bridgemohan, P., Singh, K., Cazoe, E., Perry, G., Mohamed, A., & Bridgemohan, R. (2017). Cocoa floral phenology and pollination: Implications for productivity in Caribbean Islands. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 9(7), 106–117.
- Christensen, P. B. (1986). Pollen morphological studies in Malvaceae. *Grana*, 25(2), 95–117.
- Crang, R., Lyons-Sobaski, S., & Wise, R. (2018). *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants*. Springer.
- Demarco, D. (2017). Histochemical analysis of plant secretory structures. In C. Pellicciari & M. Biggiogera (Eds.), *Histochemistry of Single Molecules Methods and Protocols* (Vol. 2566, pp. 291–310). Humana Press.
- de Jesus-Branco, S. M., da Silva, D. V., Lopes, U. V., & Corrêa, R. X. (2018). Characterization of the sexual self- and cross-compatibility in genotypes of cacao. *American Journal of Plant Sciences*, 9(9), 1794–1806.
- Dias, M., & Ribeiro, F. D. (2015). Pollen morphology and exine ultrastructure of selected species of *Waltheria* L. (Byttnerioideae-Malvaceae). *Review of Palaeobotany and Palynology*, 221, 204–210.
- Fernández, J., Talle, B., & Wilson, Z. A. (2015). Anther and pollen development: a conserved developmental pathway. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(11), 876–891.
- Ford, C. S., & Wilkinson, M. J. (2012). Confocal observations of late-acting self-incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Sexual Plant Reproduction*, 25(3), 169–183.
- 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., & Rosenfeldt, S. (1998). The pollen development in *Ceiba insignis* (Kunth) Gibbs and Semir ex *Chorisia speciosa* St Hil. (Bombacaceae). *Phytomorphology*, 48(2), 121–129.
- Galati, B. G., Monacci, F., Gotelli, M. M., & Rosenfeldt, S. (2007). Pollen, tapetum and orbicule development in *Modiolastrum malvifolium* (Malvaceae). *Annals of Botany*, 99(4), 755–763.
- Galati, B. G., Gotelli, M. M., Rosenfeldt, S., Torretta, J. P., & Zarlavsky, G. (2011). Orbicules in relation to the pollination modes. In B. J. Kaiser (Ed.), *Pollen: structure, types and effects* (pp. 1–15). Nova Science Publisher.
- García, T. B., de Vilhena, R. C., Souza T. Y., Demarco, D., & Andrade A. C. (2014). Leaf anatomical features of three *Theobroma* species (Malvaceae s.l.) native to the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica*, 44(3), 291–300.
- Halbritter, H. (2017). *Guazuma ulmifolia*. PalDat-A palynological database. https://www.paldat.org/pub/Guazuma_ulmifolia/302981
- 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.
- Hamdy, R., & Shams, E. (2010). Pollen morphology of Sterculiaceae (s. str.) in Egypt and its taxonomic significance. *Egyptian Journal of Botany*, 50, 103–117.
- Heslop-Harrison, J. (1966). Cytoplasmic connections during spore formation in flowering plants. *Endeavour*, 25, 65–72.
- Heslop-Harrison, J. (1974). The physiology of the pollen grain surface. *Proceedings of the Royal Society of London*, 190(1100), 275–299.
- Heslop-Harrison, Y., & Heslop-Harrison, J. (1982). The microfibrillar component of the pollen intine: some structural features. *Annals of Botany*, 50(6), 831–842.



- Lanaud, C., Fouet, O., Legavre, T., Lopes, U., Sounigo, O., Eyango, M. C., Mermaz, B., Da Silva, M. R., Loor, R. G., Argout, X., Gaypay, G., Ebaiarrey, H. E., Colonges, K., Sanier, C., Rivallan, R., Mastin, G., Cryer, N., Boccara, M., Verdeil, J. L., ... Clément, D. (2017). Deciphering the *Theobroma cacao* self-incompatibility system: from genomics to diagnostic markers for self-compatibility. *Journal of Experimental Botany*, 68(17), 4775–4790.
- Lattar, E. C., Galati, B. G., & Ferrucci, M. S. (2012). Ultrastructural study of pollen and anther development in *Luehea divaricata* (Malvaceae, Grewioideae) and its systematic implications: Role of tapetal transfer cells, orbicules and male germ unit. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(12), 888–894.
- Lattar, E. C., Galati, B. G., & Ferrucci, M. S. (2014). Comparative study of anther development, microsporogenesis and microgametogenesis in species of *Corchorus*, *Heliocarpus*, *Luehea* and *Triumfetta* (Malvaceae: Grewioideae) from South America. *New Zealand Journal of Botany*, 52(4), 429–445.
- Lattanzio, V., Lattanzio, M. T. V., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In F. Imperato (Ed.), *Phytochemistry: Advances in Research* (pp. 23–67). Research Signpost.
- López, J. G., López, L. E., Avendaño, C. H., Aguirre, J. F., Espinosa, S., Moreno, J. L., Mendoza, A., & Suárez, V. G. M. (2018). Biología floral de cacao (*Theobroma cacao* L.); criollo, trinitario y forastero en México. *Agroproductividad*, 11(9), 129–136.
- Nadot, S., Furness, C. A., Sannier, J., Penet, L., Triki Teurtroy, S., Albert, B., & Ressayre, A. (2008). Phylogenetic comparative analysis of microsporogenesis in angiosperms with a focus on monocots. *American Journal of Botany*, 95(11), 1426–1436.
- Narayanapur, V. B., Suma, B., & Minimol, J. S. (2018). Self-incompatibility: a pollination control mechanism in plants. *International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar)*, 13(1), 201–212.
- N'Zi, J. C., Kahia, J., Diby, L., & Kouamé, C. (2017). Compatibility of ten elite cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones. *Horticulturae*, 3(3), 45.
- Osorio, J. A., Berdugo, J., Coronado, R. A., Zapata, Y. P., Quintero, C., Gallego, G., & Yockteng, R. (2017). Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of *Theobroma cacao* L. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1994.
- Pacini, E. (2010). Relationships between tapetum, loculus, and pollen during development. *International Journal of Plant Sciences*, 171(1), 1–11.
- Pacini, E., & Hesse, M. (2012). Uncommon pollen walls: reasons and consequences. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich*, 148, 291–306.
- Perveen, A., & Qaiser, M. (2009). Pollen flora of Pakistan-Malvaceae: Dombeyoideae-Lxii. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), 491–494.
- Prieu, C., Toghranegar, Z., Gouyon, P. H., & Albert, B. (2019). Microsporogenesis in angiosperms producing pantoporate pollen. *Botany Letters*, 166(4), 457–466.
- 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), 1–81.
- Ramming, D. W., Hinrichs, H. A., & Richardson, P. E. (1973). Sequential staining of callose by aniline blue and lacmoid for fluorescence and regular microscopy on a durable preparation of the same specimen. *Stain Technology*, 48(3), 133–134.
- Rangel, M. A., Zavaleta, H. A., Córdova, L., López, A. P., Delgado, A., Vidales, I., & Villegas, Á. (2012). Anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo mexicano. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 35(3), 189–197.
- Richardson, J. E., Whitlock, B. A., Meerow, A. W., & Madriñán, S. (2015). The age of chocolate: a diversification history of *Theobroma* and Malvaceae. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 120.
- 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., Zarate, D. A., Castañeda, G. A. A., Cuarán, V. L., & Passarelli, L. M. (2021a). Micromorfología 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.
- 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.
- 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.
- Sánchez, V., Zambrano, J. L., Iglesias, C., Rodríguez, E., Villalobos, V., Díaz, F. J., Carrillo, N., Gutiérrez, A., Camacho, A., & Rodríguez, O. (2019). *La cadena*

- de valor del cacao en América Latina y el Caribe.* FONTAGRO, ESPOL, INIAP.
- Scott, R. J., Spielman, M., & Dickinson, H. G. (2004). Stamen structure and function. *The Plant Cell*, 16(S1), S46–S60.
- Squicciarini, M. P., & Swinnen, J. (2016). *The Economics of Chocolate*. Oxford University Press.
- Sivachandran, R., Gnanam, R., Sudhakar, D., Suresh, J., & Ganesh, S. (2017). Influence of genotypes, stages of microspore, pre-treatments and media factors on induction of callus from anthers of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Plantation Crops*, 45(3), 162–172.
- Soukup, A. (2014). Selected simple methods of plant cell wall histochemistry and staining for light microscopy. In V. Žárský, & F. Cvrková (Eds.), *Plant cell morphogenesis: methods and protocols, methods in molecular biology* (pp. 25–40). Humana Press.
- Strittmatter, L. I., Galati, B. G., & Monacci, F. (2000). Ubisch bodies in the peritapetal membrane of *Abutilon pictum* Gill (Malvaceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 71, 1–10.
- Strittmatter, L. I., & Galati, B. G. (2001). Development of anthers, microsporogenesis and microgametogenesis of *Myosotis azorica* and *M. laxa* (Boraginaceae). *Phytomorphology*, 51(1), 1–10.
- Swanson, J. D., Carlson, J. E., & Guiltinan, M. J. (2008). Comparative flower development in *Theobroma cacao* based on temporal morphological indicators. *International Journal of Plant Sciences*, 169(9), 1187–1199.
- Tang, Y. A., Gao, H., Wang, C. M., & Chen, J. Z. (2006). Microsporogenesis and microgametogenesis of *Excentrodendron hsienmu* (Malvaceae s.l.) and their systematic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150(4), 447–457.
- Tang, Y. A., Gao, H., & Xie, J. Z. (2009). An embryological study of *Eriolaena candollei*
- Wallich (Malvaceae) and its systematic implications. *Flora*, 204(8), 569–580.
- Varela, M. C., Arslan, I., Reginato, M. A., Cenzano, A. M., & Luna, M. V. (2016). Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina). *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 81–91.
- Venancio, A. C., de Souza, N. C., Dias, M., & Gasparino, E. C. (2022). Pollen morphology of Malvaceae s.l. from Cerrado Forest Fragments: details of aperture and ornamentation in the pollen types definition. *Palynology*, 46(1), 1–15.
- 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, 107–134.
- von Balthazar, M., Schönenberger, J., Alverson, W. S., Janka, H., Bayer, C., & Baum, D. A. (2006). Structure and evolution of the androecium in the Malvaceae clade (Malvaceae s.l.) and implications for Malvaceae and Malvales. *Plant Systematics and Evolution*, 260, 171–197.
- Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2018). Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 4–17.
- Young, A. M., Erickson, E. H., Strand, M. A., & Erickson, B. J. (1987). Pollination biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae)—I. Floral biology. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(2), 151–164.