

VIAS DE ACCESO DE NUTRIENTES AL EMBRION EN DESARROLLO EN DOS ESPECIES DE *Stylosanthes* Sw. (FABACEAE-AESCHYNOMENEAE)

P. Izaguirre, S. Mérola y R. Beyhaut

Recibido: 26 de junio de 1997. Aceptado: 7 de julio de 1998.

RESUMEN

Con el objetivo de contribuir al conocimiento de la nutrición del embrión de leguminosas se estudian en este trabajo diferentes etapas de desarrollo del óvulo de *Stylosanthes montevidensis* Vogel y *S. leiocarpa* Vogel. Se plantea como hipótesis que durante las sucesivas etapas del desarrollo embrionario existen varias regiones definidas como responsables del acceso de nutrientes: 1) tejido de barrera o hipóstasis, que conecta el suministro vascular externo con el endosperma y forma un haustorio nuclear en la región de la chalaza y no adopta estructura celular en ninguna de sus etapas; 2) barra de traqueidas, constituida por traqueoides con grandes puntuaciones, que se forma en la madurez seminal a nivel del tegumento externo, frente al funículo; 3) zona de contacto de los cotiledones del embrión temprano con la capa amilífera del tegumento externo en el lado dorsal del óvulo-semilla; 4) suspensor formado por células protrusivas, siendo la basal de gran tamaño y activa transferencia. Se verifica por primera vez la presencia de endotelio en *Aeschynomeneae* en etapa de saco embrionario maduro. También se discuten la formación del saco embrionario, tejidos adyacentes y la estructura de la semilla por su relación con la adaptación ecológica de ambas especies.

PALABRAS CLAVE: *Stylosanthes*; barra de traqueidas; endotelio; haustorio; hipóstasis; lente; suspensor.

SUMMARY

NUTRIENT ACCESS PATHWAYS IN THE DEVELOPING EMBRYO OF TWO SPECIES OF *Stylosanthes* Sw. (FABACEAE-AESCHINOMENEAE)

In order to contribute to the knowledge of embryo nutrition in legumes, different stages in the ovule of *Stylosanthes montevidensis* Vogel and *S. leiocarpa* Vogel are studied in this paper. As an hypothesis, several definite regions are discussed as responsible for the routes of nutrient uptake processes: 1) a barrier tissue or hypostase connecting the vascular external supply with the inner endosperm at the chalazal region which has a nuclear haustorium and never adopts a cellular structure; 2) a tracheid bar formed by tracheoids with large pits located at seed maturity at the outer integument level in front of the funiculus; 3) the contacting zone of young embryo cotyledons with the starchy layer of outer integument dorsally located in the ovule-seed; 4) protrusive suspensor cells, being the basal cell oversized and in active transference. For the first time, the presence of an endothelium in *Aeschynomeneae* is reported. Embryo sac and adjacent tissues formation and seed structure and its relation to ecological adaptations of both species are also discussed.

KEY WORDS: *Stylosanthes*; endothelium; haustorium; hypostase; tracheid bar; lens; suspensor.

INTRODUCCION

El género *Stylosanthes* se halla presente en el mundo con 30 especies, encontrándose 4 entidades taxonómicas en el Uruguay: *S. montevidensis* Vogel, *S. montevidensis* Vogel var. *intermedia* Vogel, *S. leiocarpa* Vogel, y *S. guianensis* (Aublet) Swartz var. *subviscosa* Bentham (Speroni e Izaguirre, 1994). Dichas especies y variedades están adap-

tadas a suelos secos o arenosos, frecuentes en campos no roturados y muy resistentes a la sequía por su profunda raíz pivotante. El conocimiento de la constitución de la semilla y su relación con el habitat ocupado por estas especies puede mejorar la producción de semillas y por ende su utilización en las prácticas agronómicas.

Según Rosengurt (1943) sus especies son muy apetecidas por el ganado a pesar de sus tallos leñosos y hojas muy pequeñas.

Las leguminosas representan un importante componente cualitativo de la pradera natural. En nuestro país no está determinada cual es la causa de su escasez o abundancia.

Además de las causas extrínsecas, tales como clima, suelo, agua y factores estacionales, inciden preponderantemente aquellas intrínsecas, siendo de fundamental importancia, las englobadas en el aspecto reproductivo básico de las que existen muy pocos datos: autoesterilidad, anomalías en la polinización, en el comportamiento meiótico en anteras y otras que conllevan a una baja o nula producción de semilla viable, sin obviar aquellas relacionadas con los problemas rizobiológicos y simbióticos.

Con el fin de aclarar estas causas se encaró este trabajo atendiendo especialmente a la localización de los puntos de acceso de nutrientes al óvulo-semilla en etapas sucesivas de su desarrollo que se proponen como responsables en estos procesos.

Haciendo un balance de la adaptabilidad de la especie correlacionada con la estructura de la semilla, y las vías de acceso de nutrientes en ella, pueden utilizarse estos datos básicos para probar estas especies nativas que aun no han sido ensayadas en condiciones óptimas, como se ha hecho en otros países con buenos resultados.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras de *S. leiocarpa* fueron colectadas en la costa marítima en la punta de José Ignacio (Departamento de Rocha) en terreno arenoso húmedo, empastado y las de *S. montevidensis* en el Departamento de Tacuarembó. Estos materiales se conservan en el herbario de la Facultad de Agronomía (MVFA).

Las inflorescencias se fijaron en FAA (90cc alcohol etílico al 70%, 5cc formaldehído y 5cc ácido acético glacial). Se diseccionaron bajo microscopio estereoscópico, separándolas en 4 estadios fenológicos: 1) flor joven de corola cerrada, 2) flor de corola abierta, 3) fruto joven y 4) fruto maduro (figura 1), se tiñeron "in toto" con eritrosina a saturación en alcohol etílico 70% para facilitar la manipulación de las pequeñas piezas.

Se empleó la técnica de deshidratación en alcohol etílico usando toluol como intermediario, realizándose luego la inclusión en parafina. Las secciones de las piezas incluidas se realizaron a 5-8 μ con micrótopo de rotación Minot American Optical. Se usó la técnica de doble coloración con safranina fast-green. Las fotografías se tomaron con cámara Olympus C-35 y película Agfapan 25 en microscopio Olympus Vanox.

RESULTADOS

D) GINECEO

Consiste de un ovario unilocular, unicarpelar, cuyo estilo es de igual o mayor longitud que el ovario, con los óvulos curvados hacia la sutura ventral. El nervio dorsal se ramifica repetidamente en la pared carpelar que presenta vascularización reticulada. La pared externa del carpelo en

S. montevidensis, está formada por una epidermis con pelos de forma irregular que tienen un extremo generalmente romo con núcleo intensamente teñido. Bajo luz polarizada se observan cristales individuales prismáticos de oxalato de calcio en la mayoría de las células del estrato epidérmico. En *S. leiocarpa* los pelos están ausentes en el ovario a excepción de algunos pocos ubicados en el estilo, típicamente papilionáceos, (Metcalfe y Chalk, 1957) simples y con base septada bulbosa. En la subepidermis del estilo, aparecen bandas longitudinales de un estrato de células de paredes gruesas, teñidas intensamente con safranina, y con grandes vacuolas. Los vasos xilemáticos espiralados cuyas deposiciones secundarias son muy activas a la luz polarizada, transcurren a lo largo de las capas intermedias del carpelo compuestas de células de paredes celulósicas muy delgadas. La pared interna del carpelo está formada por una epidermis de células alargadas en sentido radial, muy vacuoladas y de nucleolo teñido intensamente. Estas células se dividen periclinalmente formando un estrato en columnas de 3-4 células frente al óvulo y de más de 4 entre éstos, que constituirán el endocarpo en el fruto maduro. En general, contiene dos óvulos campilótropos ascendentes (excepcionalmente 3) insertos por el funículo a la placenta sobre el nervio ventral, hacia donde se dirige también la micrópila. Los óvulos no se desarrollan simultáneamente, sino que el distal apical es más precoz y de mayor tamaño que el basal, quedando éste a veces atrofiado totalmente.

II) FORMACION DEL SACO EMBRIONARIO (Estadio fenológico 1)

El **óvulo joven**, antes de la diferenciación del arquesporio (figura 2A), está formado por 2 capas nucelares (el núcleo en este caso es pseudocrasinucelado) de células homogéneas, ordenadas concéntricamente, de núcleo prominente.

El **tegumento externo** está formado por 3 capas celulares en la zona lateral, hasta 6-8 capas en la micrópila y 10-14 capas a nivel chalazal continuándose desde la chalaza por el rafe hasta la inserción del óvulo, con células algo más alargadas que las restantes y dispuestas en filas paralelas.

El **tegumento interno** está formado por 3 capas celulares en la zona micropilar donde se prolonga en un labio con células de mayor tamaño y citoplasma menos denso que las del resto del tegumento; puede llegar a engrosarse dando hasta 4-5 capas de células de espesor y 2 capas celulares en la parte lateral.

Cuando se diferencia el arquesporio, el **nucelo** presenta una epidermis destacada con 2 capas celulares a nivel de la micrópila y 4-5 a nivel de la chalaza (figura 3A).

El **arquesporio** se diferencia a partir de una célula subhipodérmica nucelar (figuras 2B y 3A) del óvulo, que aumenta de tamaño alargándose en sentido micrópilo-chalazal y por meiosis da origen a una tetradra linear de megásporas en la que degeneran las 3 micropilares por forma-

ción de calosa en las paredes, lo que impide el pasaje de nutrientes, prevaleciendo la chalazal (figura 3C). Queda así constituida la **megáspora funcional**, de gran tamaño, citoplasma denso teñido intensamente. Dentro del material estudiado no se encontraron tetradas en forma de T, aunque a veces las 3 megásporas basales se disponen alineadas y la apical inclinada hacia la micrópila (figura 3B).

La megáspora funcional se agranda y se prepara para la división celular. El nucleolo es muy prominente, aumentando su tamaño en relación a etapas anteriores (figura 3E).

El **óvulo maduro**, tiene dos tegumentos de gran masa celular principalmente en la zona chalazal. El tegumento externo aumenta la cantidad de células considerablemente desde el funículo a la chalaza (rafe) y se hace notoria la zona de vascularización. El tegumento interno mantiene 3 capas celulares en su zona chalazal. Ambos limitan al nucleolo proporcionando una cavidad curva donde se formará el saco embrionario. Dicha cavidad se agranda a expensas de la digestión del nucleolo, principalmente en longitud desde la chalaza hacia la micrópila a medida que aumenta el tamaño de la megáspora funcional (figura 3D).

La **micrópila** es típicamente en zig-zag en esta etapa, y se forma por el exostoma (tegumento externo), siendo entonces perpendicular a la inserción del óvulo y el endostoma (tegumento interno). En estadios tempranos se presenta alineada al eje del ovario. El canal micropilar formado por el tegumento interno perpendicular al formado por el tegumento externo, queda cubierto por él y se orienta en ángulo de más o menos 30-35° respecto del estilo. El tegumento externo deja entonces una abertura en dirección oblicua hacia la sutura ventral no alineada con el canal micropilar del tegumento interno (figura 4A). A su nivel se conforma primitivamente la estructura del hilo en la inserción del funículo con forma de círculo en vista ventral, constando de 3 capas celulares en la zona lateral dorsal.

El nucleolo al fin de esta etapa, queda conformado por 3 capas celulares dispuestas paralelamente a cada lado de la cavidad del saco embrionario. En los extremos las células son pequeñas, de forma irregular manteniendo el grupo chalazal una mayor masa celular.

Una vez dividido el núcleo de la megáspora, antes de la separación de las células resultantes, continúa la desorganización del nucleolo evidenciado por restos de células colapsadas, que dejan mayor espacio entre los 2 núcleos del saco embrionario haciéndose mayor la cavidad del mismo (figura 3F). Queda así constituido el **saco embrionario 2 celular**.

Seguidamente sólo se observa la epidermis nucelar bajo la micrópila, quedando una masa celular escasa de nucleolo sobre ambos extremos (micropilar y chalazal) y se observan células colapsadas en el límite con el saco embrionario. Los dos núcleos del saco embrionario se dividen disponiéndose 2 en cada polo unidos por citoplasma de estado cenocítico, quedando así formado el **saco embrionario 4 celular**.

En esta etapa el tegumento externo tiene 3 capas celulares en la zona lateral dorsal y hasta 8 capas en las zonas ventral y micropilar, mientras que el tegumento interno mantiene su estructura anterior.

A medida que continúa el desarrollo del óvulo, la capa más interna del tegumento interno se divide anticlinalmente y queda constituida por células ordenadas, de forma rectangular, con diámetro mayor perpendicular al eje, citoplasma granuloso, núcleo prominente y nucleolo destacado que además se tiñe de forma más intensa que el resto. Este proceso comienza por la zona lateral desde el extremo micropilar hacia el chalazal, donde estas células son más reducidas en su diámetro mayor, originando el **endotelio** (figura 3G).

Mientras se constituye el endotelio, se desintegra la epidermis nucelar a nivel de las zonas laterales de la micrópila, prevaleciendo las células más cercanas a ella y el grupo lateral chalazal. Se observan restos de las paredes que limitan el endotelio formado. Las células de la epidermis nucelar micropilar aumentan considerablemente de tamaño, su citoplasma desarrolla grandes vacuolas y el núcleo se hace poco denso. Se disponen bordeando y obstruyendo el orificio micropilar, a modo de obturador contactando con el aparato oosférico (figura 3G).

En el óvulo, el nucleolo se presenta casi desintegrado, con esas 2-3 células en el ápice micropilar y restos de paredes celulares en los lados del saco embrionario. En la zona chalazal se mantienen varias capas, lo que indicaría probablemente que la desorganización del mismo se esté haciendo desde la micrópila hacia la chalaza, antes de la fecundación. Las células remanentes se presentan organizadas en líneas que se prolongan hacia la chalaza. Son células alargadas con su diámetro mayor paralelo al eje del estilo, de núcleo denso y citoplasma progresivamente más vacuolado a medida que avanza el desarrollo.

Continúa la división de las 4 células del saco embrionario hasta que éste se encuentra formado por: la oósfera, de forma esférica, que aparece teñida de rojo con núcleo prominente y nucleolo destacado, citoplasma vacuolado y granuloso (figura 3H); las sinérgidas, alargadas, flanquean la oósfera; los núcleos polares aparecen muy prominentes dentro del citoplasma cenocítico granuloso de la célula central; las antípodas se ubican en el extremo chalazal; en *S. leiocarpa* son muy pequeñas y efímeras contrastando con las de *S. montevidensis* en que se distinguen claramente triangulares con citoplasma denso, núcleo y nucleolos pequeños y muy prominentes (figura 4A). Queda constituido por lo tanto el **saco embrionario maduro**.

III) FECUNDACION (Estadio fenológico 2)

La micrópila presenta material teñido de rojo intenso debido a remanentes del tubo polínico. El material espermático ingresa al saco embrionario provocando la desintegración de las sinérgidas, apareciendo ambas amorfas e

intensamente teñidas (figura 4B). El contenido del tubo polínico se observa como una masa característica granulosa y violácea dispuesta alrededor del aparato oosférico. Seguidamente se produce la **fecundación**, formándose el cigoto. Las antípodas desaparecen luego de la fecundación y la masa nucelar chalazal se desintegra aún más hacia la parte proximal del saco embrionario (figura 3I).

IV) ZIGOTO

Luego de la fecundación el cigoto toma forma esférica, el núcleo ocupa la posición central con el nucleolo de gran tamaño y muy prominente. El citoplasma es muy denso, conteniendo gránulos y grandes vacuolas periféricas. Contacta con la célula epidérmica nucelar que obstruye la micrópila, lo que indicaría una asociación para la futura nutrición del embrión, mostrando esta zona de contacto un evidente volumen vacuolar.

Se mantienen adosados restos de sinérgidas que no han terminado de colapsarse. El citoplasma cenocítico de la célula media se vuelve denso y los núcleos polares luego de la fusión con el núcleo espermático constituyen el endosperma y proliferan formando un grupo que ocupa principalmente la zona central de la cavidad del saco embrionario. Las células nucleares en las líneas centrales, antes citadas, orientadas hacia el polo chalazal, comienzan a colapsarse al mismo tiempo que las laterales, para dar espacio al crecimiento de la cavidad del saco embrionario.

V) PROEMBRION

El cigoto inmediatamente se divide dando lugar a las células apical y basal, las cuales continuarán dividiéndose constituyendo finalmente el **proembrión**.

La cavidad del saco embrionario contiene al incipiente proembrión y a los núcleos endospermáticos (figura 4C) que intervienen directamente en la nutrición del mismo. El proembrión queda suspendido en la cavidad del saco embrionario sin contactar con célula alguna (figura 5A). Los núcleos endospermáticos ocupan dicha cavidad alrededor del proembrión, agrupándose en mayor número hacia la zona chalazal a medida que avanza el desarrollo y contactan con esta vital región del óvulo. Las células nucleares periféricas que limitan con el endotelio se vacuolizan aún más. La división celular del proembrión continúa hasta formar el embrión.

VI) EMBRION

Está constituido por una parte globosa orientada hacia la zona chalazal y, orientado hacia la micrópila, el suspensor. Este último prolifera por división de la célula basal dando células vacuoladas, alineadas, rectangulares con su

eje mayor en el sentido de la micrópila empujando al embrión hacia el polo chalazal. Continúa dividiéndose y permanece en contacto con las células obturadoras o micropilares por una gran vacuola.

VII) FORMACION DE LA SEMILLA (Estadio fenológico 3)

Durante esta etapa el embrión continúa su desarrollo y se observa una fuerte curvatura del saco embrionario.

La **cubierta seminal** (figura 5B), queda constituida de afuera hacia adentro por una capa en empalizada de macroesclereidas, que se tiñen de color rojo, con el núcleo ubicado en posición central. Al lado del hilio, opuesto a la micrópila en superficie se aprecia un alargamiento de las macroesclereidas en sentido de su eje mayor, formando éstas el característico **lente** de las semillas de leguminosas.

El tegumento interno queda reducido a 2 capas de células aplanadas, mientras que el endotelio, a unas pocas células a nivel de la micrópila y chalaza.

En *S. leiocarpa* el lente está formado por un único estrato de macroesclereidas con su eje mayor en sentido radial, formando en su totalidad una convexidad hacia el exterior de la semilla. En la parte central del lente, en posición subepidérmica, las macroesclereidas por divisiones periclinales de las células de su capa interna, forman un grupo de 3-5 células de paredes engrosadas de diámetro mayor que las originales (células tuberculadas) (figura 5F). La línea interna del lente es relativamente recta en este caso. En *S. montevidensis* el lente en un principio se forma por alargamiento de las macroesclereidas al igual que en *S. leiocarpa* pero en etapas más avanzadas de la maduración se dividen periclinamente en su capa interna varias veces; queda formado finalmente por las macroesclereidas y una hipodermis de varios estratos irregulares de células, que luego se esclerifican, y toman aspecto semejante a las astroesclereidas. El lente en este caso es de superficie interna cóncava, pero no sobresale en la superficie exterior (figura 5E). A nivel de la inserción del funículo, por debajo de la capa de macroesclereidas rodeando la **barra de traqueidas** y la micrópila se encuentran las astroesclereidas, de forma irregular, de paredes regularmente engrosadas y citoplasma denso (figura 5G).

Las capas nucleares de la zona chalazal resultan más tarde digeridas, pero persisten restos de las mismas; las más externas forman una masa en la base de la cavidad que aparece coloreada y refringente, constituida por células alineadas hacia la chalaza, constituyendo un **tejido de barra o hipóstasis**, característico (figura 5C). Las más internas contactan con los núcleos del endosperma y contribuyen también de otra manera a resolver el sistema nutricional del embrión.

La **célula del suspensor** que contacta con el endotelio, adquiere tamaño y forma relevantes (figura 5D). A través de

ésta célula los núcleos endospermáticos contactan con el embrión (figura 6A). El resto de las células del suspensor son de menor tamaño, laxas, de forma irregular, de núcleo pequeño teñido de rojo intenso y con grandes vacuolas.

El endosperma se presenta con los núcleos libres inmersos en citoplasma denso y granuloso. Estos rodean al suspensor a nivel de la base de la cavidad del saco embrionario, quedando restringidos al borde del saco embrionario llegando hasta la zona chalazal. Debido a una posible actividad haustorial de la parte chalazal del endosperma ocurre una gradual digestión de la base del nucelo.

Frente al funículo aparece una zona de células más alargadas que las restantes indicando el inicio de la formación de las **traqueoides** que aparecen en la semilla madura. El haz vascular (figuras 6A, 6B y 7B), formado por vasos espiralados, penetra por el funículo, se curva hacia la zona chalazal extendiéndose paralelamente a la cubierta seminal y se separa de ésta por 4-5 capas de células de forma oval, citoplasma denso y núcleo teñido de rojo intenso. Contacta hacia el interior con las **capas intermedias** cuyas células contienen abundante almidón.

El embrión continúa su división celular hasta quedar formado por la radícula y los cotiledones, constituyendo así la **semilla**.

La radícula está formada por células isodiamétricas, de menor tamaño que las que tenía el suspensor, de citoplasma denso, núcleo y nucleolo más pequeño. En la zona hipocotilar, las células toman forma rectangular, son muy densas y forman un tejido compacto que constituyen las células iniciales procambiales. En los cotiledones son isodiamétricas, muy densas, forman un tejido compacto y homogéneo salvo en las zonas de futura vascularización. Los cotiledones se adosan a las capas intermedias formadas por el tegumento externo hacia la cara dorsal de la semilla, cuyas células están colmadas de almidón. Entre las células de las capas intermedias y de los cotiledones se ubican los núcleos endospermáticos (figuras 7B y 7C).

VIII) SEMILLA MADURA (Estadio fenológico 4)

La zona interna del tegumento externo presenta menor espesor, sus células están desorganizadas, con núcleo teñido intensamente, rodeando al orificio micropilar y frente al funículo las astroesclereidas se mantienen del mismo modo que en el estadio anterior. El tegumento interno se encuentra casi colapsado y digerido, aunque algunas células dispersas y una capa de restos de paredes aún contactan con el tegumento externo.

Al madurar la semilla, la capa de macroesclereidas permanece incambiada en tamaño y extensión, excepto por sus paredes que se tiñen de color rojo muy intenso, marcando quizás así un cambio en la constitución de la lignina, apareciendo conspicuamente a la luz polarizada con color violáceo. Por debajo de ellas aparece una capa de una sola fila de osteoesclereidas (hour-glass cells) de me-

nor tamaño que el resto de las células del tegumento, cuyas paredes son ópticamente muy activas a la luz polarizada (figuras 5H y 6B). El tejido de barrera o hipóstasis aún persiste en la chalaza conectando el haz vascular con restos del endosperma nuclear (figuras 6A y 6B).

Frente al funículo queda formada finalmente la barra de traqueidas, constituida por traqueoides, alargadas, lignificadas, con paredes ópticamente activas a la luz polarizada, con puntuaciones y su eje longitudinal orientado perpendicularmente al hilio, terminando algunas de ellas en extremos agudos o romos (figuras 5G, 5I, 6B). Esta barra se extiende sagitalmente desde la micropila hasta contactar con el haz vascular que se dirige hacia la chalaza aunque es piriforme en corte transversal (figuras 5G y 6B). Es a través de la barra de traqueidas, por su estructura, que los nutrientes circulan desde zonas extraovulares hasta el interior de la semilla.

El embrión ocupa toda la cavidad de la semilla. La radícula está muy desarrollada, con las células iniciales de la cofia de forma rectangular y paredes finas teñidas de rojo intenso y núcleo grande que se dividen transversalmente. Los cordones procambiales aparecen diferenciados en células alargadas, de núcleo grande y nucleolo teñido intensamente con citoplasma denso y granuloso. El resto de las células de la radícula son también rectangulares con núcleo pequeño que se tiñe intensamente y algunas de ellas son binucleadas y de citoplasma muy vacuolado y granuloso.

En el epicótilo se distingue la gémula acompañada de primordios foliares. Los cotiledones se constituyen de células irregulares más pequeñas que las de la radícula y se tiñen de color rojo más intenso que las restantes del embrión presentando zonas con abundante almidón. Algunas de ellas se diferencian por su citoplasma más denso y vacuolado y en forma laxa disponiéndose como eslabones, que acompañan la formación de células procambiales.

El embrión presenta cotiledones simétricos con pecíolos que sólo pudieron ser observados con el microscopio a aumentos de 40X; son del tipo ampliamente elíptico, de ápice obtuso con la base cordada y sistema vascular palmado, con 3 nervios principales y 2 laterales (3+2).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

GINECEO

En *Stylosanthes* se desarrolla primero el óvulo distal; siendo en *S. montevidensis* el único que llega a la madurez; en *S. leiocarpa* pueden llegar ambos o sólo el distal. En *Glycine max* (Kato *et al.* 1954, en Prakash y Chan, 1976) señalan una diferenciación más rápida en el óvulo distal; en cambio Prakash y Chan (*op. cit.*) reportan un desarrollo sincronizado de los óvulos y a veces un desarrollo más rápido del óvulo basal lo que nunca sucedió en ninguna de las dos especies observadas.

MEGASPOROGENESIS

El arqueporio en *Stylosanthes* consiste de una sola célula central del nucelo, contrariamente a lo citado por Prakash (1987) para las *Papilionoideae* donde es común un arqueporio multicelular. Sin embargo Prakash y Chan (op. cit.) coinciden con lo observado en el arqueporio que es unicelular y se divide para formar una célula parietal hacia la micrópila y una esporógena que se agranda y funciona directamente como la célula madre de las megásporas.

La tetraada observada en *Stylosanthes* es lineal. En otras leguminosas como *Glycine max* (George *et al.*, 1979), *Asragalus* (Maldonado, 1982) y en *Lotus* (Rin *et al.*, 1990), se observaron dispuestas en T.

La preparación de la megáspora para la fase gametofítica en *Stylosanthes* se da por aumento de tamaño y vacuolización, lo que también ha sido observado por Prakash (1987) en otras leguminosas.

SACO EMBRIONARIO

El desarrollo del saco embrionario en *Stylosanthes* es del tipo *Polygonum* y existe doble fertilización concordando con Prakash y Chan (1976). Las antípodas son efímeras como ocurre en la mayoría de las leguminosas según las observaciones realizadas en este trabajo y por Prakash (1987).

ENDOTELIO

En estas especies se observó endotelio desde la maduración del saco embrionario hasta muy avanzado el desarrollo del embrión. Según Prakash (op. cit.), hasta el momento sólo se encontró endotelio en las tribus *Phaseoleae* y *Abreae*; para dicho autor la presencia/ausencia de endotelio constituye un carácter taxonómico. En *Adesmia securigerifolia* de la tribu *Adesmieae*, Izaguirre *et al.* (1994) observaron su formación inmediatamente luego de la fecundación.

ENDOSPERMA

De acuerdo con Anantaswamy (1953) en *Stylosanthes* no se forma un tejido endospermático celular. Concuere a Johri y Garg (1959) en que permanece en estado nuclear durante toda la vida del endosperma hasta casi su total desaparición.

Con respecto al endosperma nuclear, en *Stylosanthes* los núcleos polares se dividen luego de la fusión con el núcleo espermático formando un grupo que se ubica en la parte central del saco embrionario. Esto no ha sido observado según Prakash (op. cit.) para otras leguminosas en un estadio tan poco avanzado, ya que al comenzar las divisiones los nú-

cleos se ubican en la periferia del saco embrionario. Así sucede al avanzar la maduración del embrión en *Stylosanthes*.

VIAS DE ACCESO DE NUTRIENTES AL EMBRION EN DESARROLLO

1) A nivel de la chalaza se observa el característico **tejido de barrera o hipóstasis** descrito por Van Tieghem (1901) formado por células de origen nuclear cuyas paredes se lignifican. Ha sido citado por Anantaswamy (1951 y 1953) para *Papilionoideae*.

En la zona chalazal el endosperma presenta una gradual digestión de la base del nucelo que también ha sido observada en *Glycine*, *Teramnus*, *Atylosia* y otras *Phaseoleae* por Anantaswamy (1953), lo que evidencia la actividad haustorial de esta zona del endosperma. Según Zindler-Frank (1987), el endosperma es considerado como fuente y regulador de nutrientes para el desarrollo del embrión actuando como intermediario entre la planta materna y el embrión hijo. Las hormonas, especialmente las citoquininas que actúan movilizando nutrientes y las giberelinas necesarias para el crecimiento del embrión son transportadas desde la planta parental y acumuladas en el endosperma.

En ambas especies de *Stylosanthes* se considera la hipóstasis como responsable de la economía de agua y nutrientes, dado que el haz vascular llega a la base ovular en el punto preciso en que contactan el endosperma haustorial y el nucelo basal, que a su vez presentan invaginaciones de pared entre sí.

2) La **barra de traqueidas** observada en este material presenta una banda de traqueoides lignificadas con puntuaciones grandes del tamaño del diámetro de la célula. Según Lersten (1982) eventualmente podrían contribuir a la taxonomía con un estudio más profundo en base a forma y ornamentaciones en las *Papilionoideae*.

Este dispositivo actuaría en *Stylosanthes* como elemento de la difusión de nutrientes provenientes del exterior del óvulo desde el haz vascular funicular opuesto al surco hilar hacia las capas intermedias.

3) En la etapa temprana de embrión cordiforme es muy significativa la abundancia de almidón en las **capas intermedias derivadas del tegumento externo**. Johansson y Walles (1993) observaron acumulación de almidón en tempranos estadios de la ontogenia de la semilla de *Vicia faba*.

Los cotiledones de *Stylosanthes* en formación se presentan adnados a las paredes del tegumento externo en la zona lateral del óvulo donde se observa claramente la presencia de almidón. Los intermediarios aparentes para la transferencia de solutos desde esta capa hacia el interior son los núcleos esparcidos del endosperma que permanecen entre ambas estructuras.

4) El **suspensor** que presenta en las diferentes especies muy variadas morfologías, ocasionalmente puede desarrollar células haustoriales protrusivas hacia adentro de la ca-

vidad del saco embrionario absorbiendo nutrientes del fluido circundante (Anantaswamy Rau, 1953); en otros casos la célula basal del suspensor se inserta como en *Stylosanthes* dentro de la micropila y presenta notorias invaginaciones de pared. En *Adesmia securigerifolia*, Izaguirre *et al.* (1994) observaron la presencia de dos células falcadas, grandes, que también se ubican a nivel del polo micropilar.

En *Stylosanthes* está constituido por células vacuoladas, rectangulares en toda su longitud, excepto la basal que es globosa, de gran tamaño y contacta con la epidermis nuclear. De este modo contribuyen eficazmente a la actividad de transferencia de metabolitos hacia el interior del embrión.

Las semillas exalbuminadas utilizan diversas estrategias en el curso de su ontogenia para la admisión de nutrientes. Las leguminosas, que también tienen semillas con esos caracteres peculiares, presentan varios puntos de acceso como los que se han encontrado en *Stylosanthes*.

ESTRUCTURA DE LA SEMILLA: LENTE

Dentro del género se diferencié *S. montevidensis* de *S. leiocarpa* por la estructura de la hipodermis del lente, la cual está formada por células tuberculadas, esclerosadas, (Manning y Van Staden, 1985 en Van Staden *et al.* 1989). En *S. montevidensis* son varios estratos irregulares que determinan una concavidad en la cara interna del lente, mientras que en *S. leiocarpa* es un pequeño grupo y la cara interna es recta. Este tipo de células según Van Staden *et al.* (op. cit.) en las semillas de *Papilionoideae* está en relación con la función del lente respecto a la entrada de agua a la semilla en esa zona durante la germinación. En *Vigna umbellata*, (Gopinathan y Babu, 1985 en Van Staden *et al.* 1989), la permeabilidad de la semilla está asociada a la presencia de tejido parenquimático debajo del lente; en semillas duras dicho tejido es esclerenquimático. Estos autores consideran a la testa y al lente como un sistema integrado, siendo el lente el punto sensible a los factores de *stress* que pueden ser transmitidos por la testa. Además es donde se produce la ruptura para la entrada de agua. La diferencia observada probablemente sería indicadora de la adaptación ecológica para la sobrevivencia en distintos ambientes, como lo ejemplifican estas dos especies, ya que *S. montevidensis* predomina en suelos pedregosos y *S. leiocarpa* en suelos arenosos donde se dispone de una mayor retención de agua.

En la semilla, según Smith (1981), las formas cotiledonares en *Papilionoideae* son las más alargadas y la base varía desde cuneada a obtusa y ocasionalmente cordada como en *Stylosanthes*. La forma y simetría de los cotiledones están reflejados en el sistema vascular (Scott y Smith, op. cit. Smith 1981). En este caso es coincidente la forma elíptica con un sistema vascular palmado con 3 nervios principales y 2 laterales (3+2). Las *Papilionoideae* (Smith, op. cit.) presentan todos los tipos de vascularización, pero lo más común en ellas es el tipo palmado (3+2) como en

Stylosanthes. El margen peciolar y la base cotiledonar, no presentan características especiales.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean expresar su agradecimiento a SA-REC (Swedish Agency for Research and Cooperation in Developing Countries) por financiar parte de este estudio en 1992; a la Lic. Gabriela Speroni por su ayuda con las ilustraciones realizadas a tinta y al Lic. Nestor Campal por su colaboración en el manejo del microscopio polarizador.

BIBLIOGRAFIA

- ANANTASWAMY, R. M. 1951. The endosperm in some of the *Papilionaceae*. *Phytomorphology* 1(3-4):153-158.
- . 1953. Some observations on the endosperm in *Papilionaceae*. *Phytomorphology* 3:209-222.
- GEORGE, G. P.; GEORGE, R. A. y HERR Jr, J. M. 1979. A comparative study of ovule and megagametophyte development in field-grown and greenhouse-grown plants of *Glycine max* and *Phaseolus aureus*. (*Papilionaceae*). *Amer. J. Bot.* 66(99):1033-1043.
- IZAGUIRRE, P.; MEROLA, S. y BEYHAUT, R. 1994. Seed ontogeny in *Adesmia securigerifolia* (*Fabaceae-Adesmieae*). *Nord. J. Bot.* 14(5):547-556.
- JOHANSSON, M. y WALLE, B. 1993. Functional anatomy of the ovule in broad bean (*Vicia faba* L.). I. Histogenesis prior to and after pollination. *Int. J. Plant. Sc.* 154(1):80-89.
- JOHRI, B. M. y GARG, S. 1959. Development of endosperm haustoria in some *Leguminosae*. *Phytomorphology* 9 (1):34-36.
- LERSTEN, N. R. 1982. Tracheid bar and vestured pits in Legume seeds (*Leguminosae: Papilionoideae*). *Amer. J. Bot.* 69(1):98-107.
- MALDONADO, S. 1982. Estudios embriológicos y palinológicos en *Astragalus* (*Leguminosae*) *Bol. Soc. Arg. Bot.* 20(3-4):201-225.
- METCALFE, C. R. y CHALK, L. 1957. *Anatomy of the Dicotyledons*. Vol. I:476-535. Oxford University Press.
- PRAKASH, N. y CHAN, Y. Y. 1976. Embryology of *Glycine max*. *Phytomorphology* 26:302-309.
- PRAKASH, N. 1987. Embryology of the *Leguminosae* en *Stirton, C. H. (ed). Advances in Legume Systematics. Part 3:241-266. Royal Botanic Gardens, Kew.*
- RIN, Y. W.; BEUSELINCK, P. R.; Mc GRAW, R. L. y SOMERS, D. A.. 1990. Megagametophyte development in *Lotus corniculatus*, *L. corimbricensis*, and their protoplast fusion hybrid. *Amer. J. Bot.* 77(8): 1084-1094.
- ROSENGURTT, B. 1943. Estudio sobre praderas naturales del Uruguay. 3a. Contribución. Barreiro y Ramos S.A. 281 pp.

SMITH, D. L. 1981. Cotyledons of the *Leguminosae* en Polhill, R. M. y Raven, P. H. (ed). *Advances in Legume Systematics*. Part 2:927-940. Royal Botanic Gardens, Kew.

SPERONI, G. y IZAGUIRRE DE ARTUCIO, P. 1994. El género *Stylosanthes* (*Fabaceae*, *Aeschynomeneae*, *Stylosanthinae*) en Uruguay. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 30(1):103-109.

VAN STADEN, J.; MANNING, J. C. y KELLY, K. M.. 1989. Legume Seeds. The structure: Function equation en C. H. Stir-

ton y J. L. Zaruchi (eds). *Advances in Legume Biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 29:417-450.

VAN TIEGHEM, PH., 1901. L'hypostase, sa structure et son role constantes, sa position et sa forme variables. *Bull. Mus. Hist. Nat.* 7:412-418.

ZINDLER-FRANK, E. 1987. Calcium oxalate crystals in Legumes en Stirton, C. H. (ed). *Advances in Legume Systematics*. Part 3:279-312. Royal Botanic Gardens, Kew.

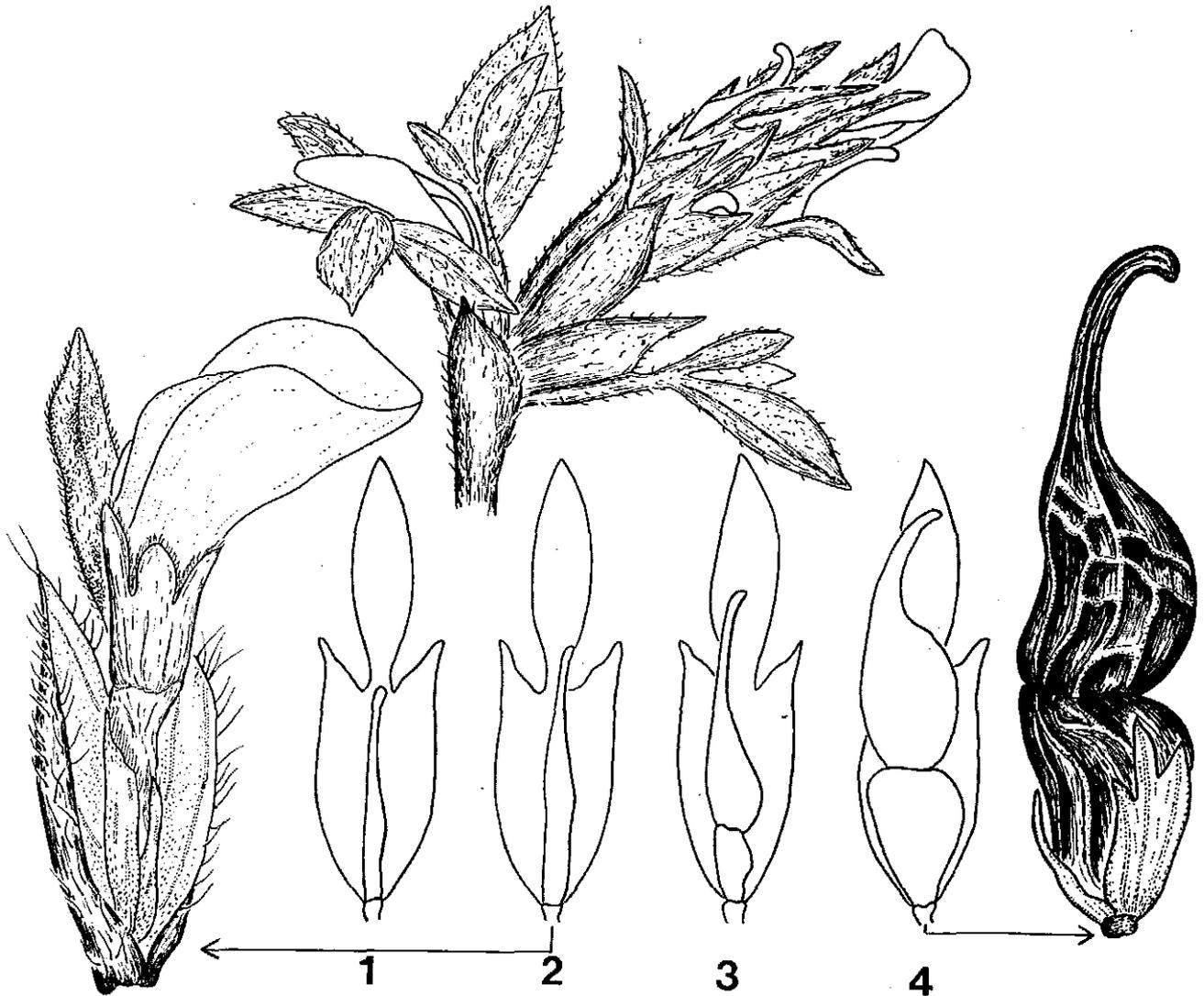


Figura 1. Esquema de *Stylosanthes leiocarpa*: Inflorescencia, flor, secuencia de estadios fenológicos del gineceo relacionados a la bráctea (1, 2, 3, y 4) y fruto.

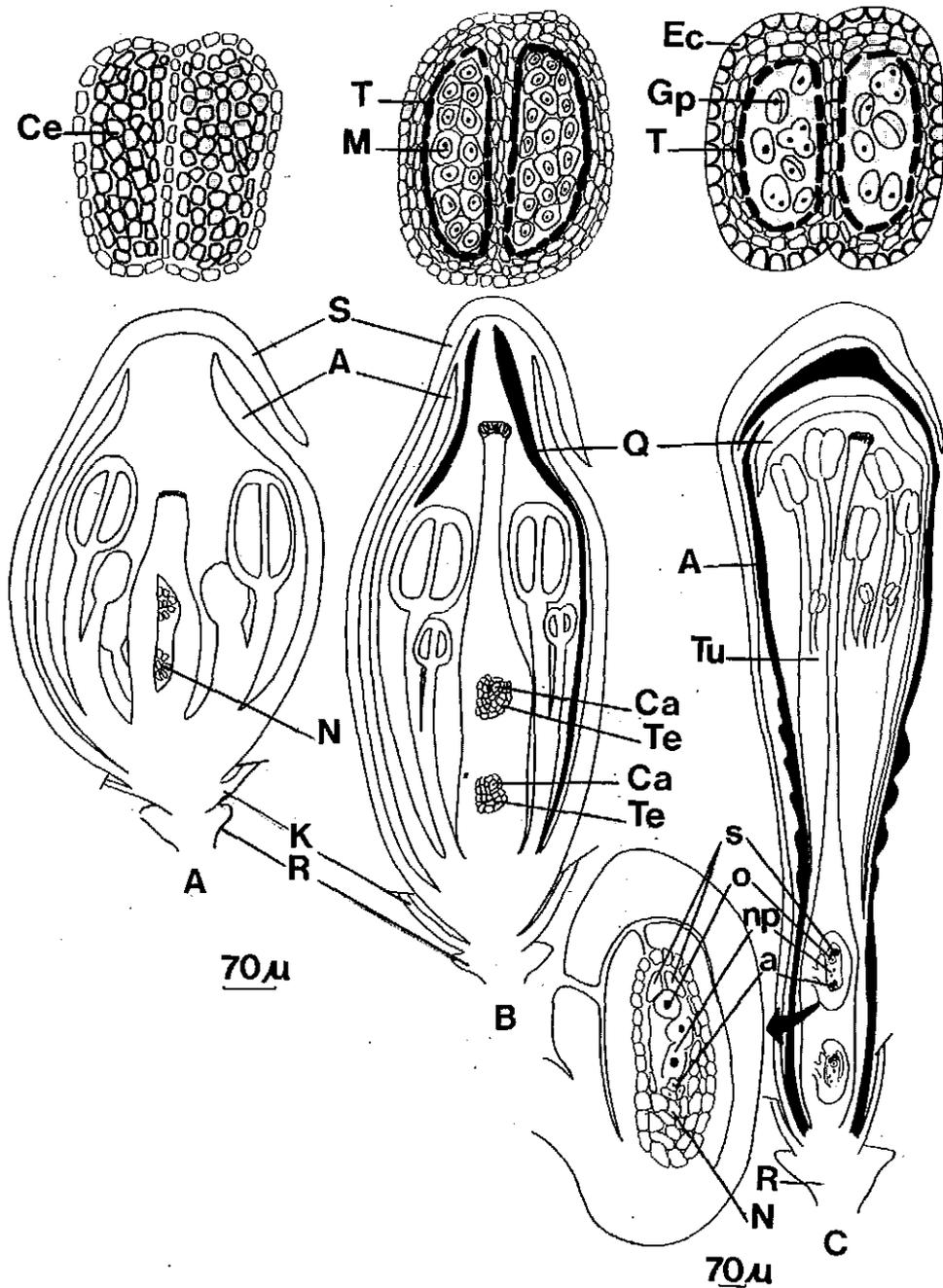


Figura 2. Esquema de la evolución correlativa del gineceo y androceo, hasta formación del saco embrionario y de los granos de polen en sección longitudinal de la flor. A: (No se presenta la quilla por no coincidir su inserción en el plano de corte). A y B: *S. leiocarpa*. C: *S. montevidensis*. A: alas; a: antípodas; Ca: célula arquesporial o arquesporio; Ce: células esporógenas; Ec: endotecio; Gp: granos de polen; K: cáliz; M: micrósporas; N: nucelo; np: núcleos polares; o: oósfera; Q: quilla; R: receptáculo; S: estándarte; s: sinérgidas; T: tapete; Te: tegumentos; Tu: tubo.

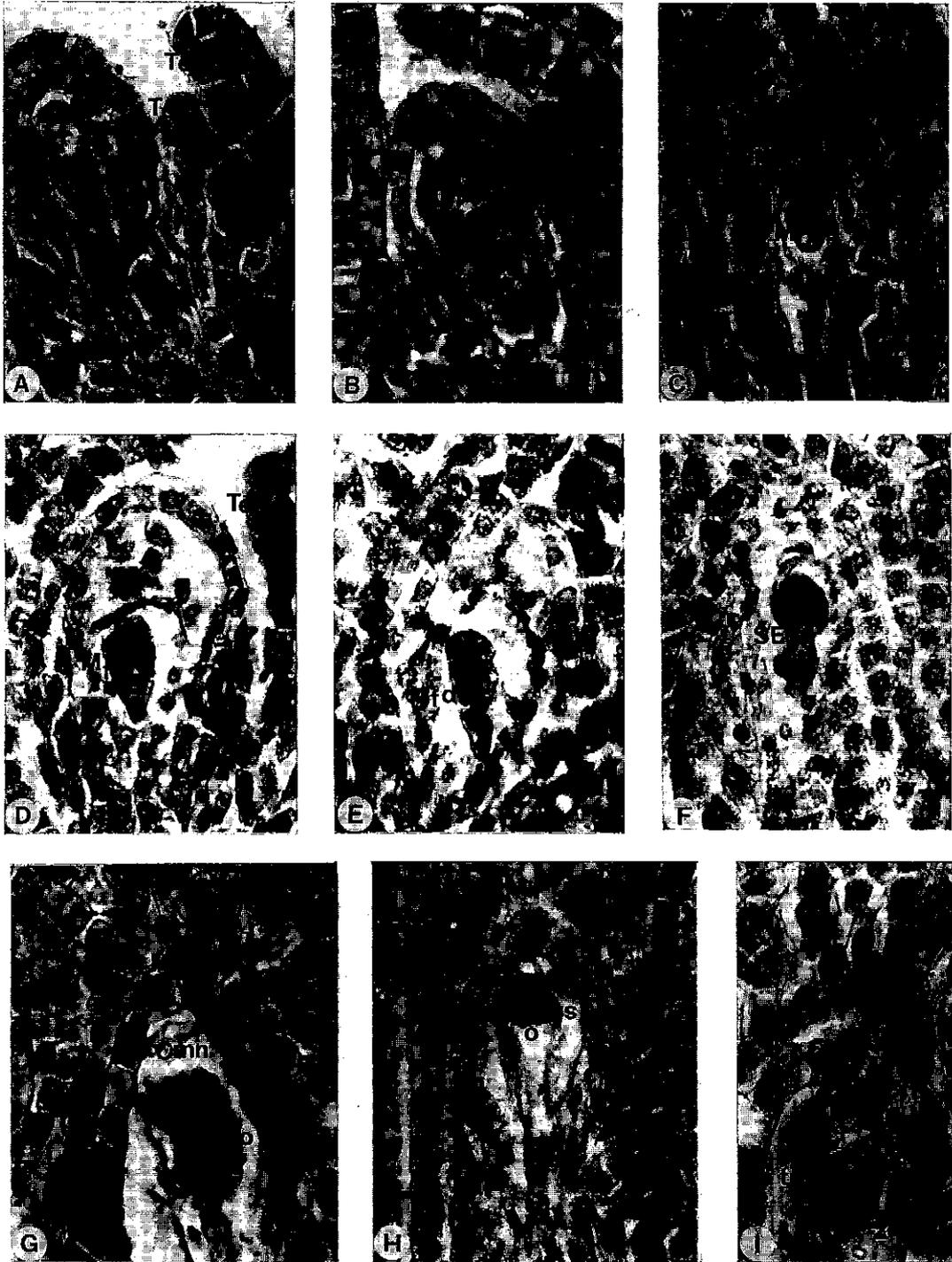


Figura 3. Evolución del óvulo desde arquesporio hasta fecundación. Todas las fotos a ca 570X. A:arquesporio. B:tetrada. C:tetrada con megáspora funcional. D:megáspora funcional. E:megáspora funcional en división. F:saco embrionario 2 nuclear. G:oófera. H:saco embrionario maduro. I:fecundación. Ca:célula arquesporial; Cnm:célula nucelar micropilar; En:endotelio; Mc:megásporas colapsadas; Mf:megáspora funcional; Mfd:megáspora funcional en división; Mic:micrópila; N:nucelo; np:núcleo polar; Tee:tegumento externo; Tei:tegumento interno; Tm:tetrada de megásporas; tp:tubo polínico; o:oófera; s:sinérgidas; SE:saco embrionario 2 nuclear; Z:zigoto.

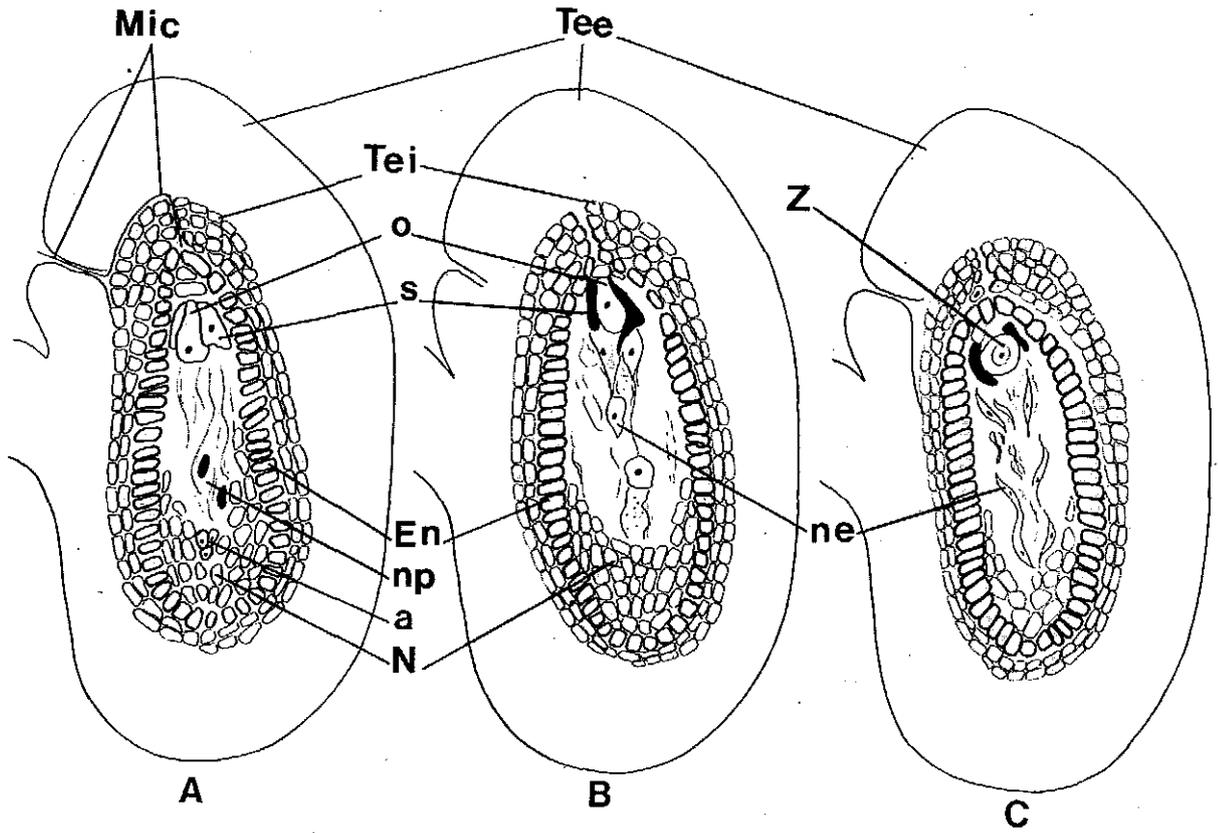


Figura 4. Esquema del desarrollo del saco embrionario hasta formación del cigoto. A: Saco embrionario. B: Fecundación. C: Cigoto. a: antípodas; En: endotelio; Mic: micropila; ne: núcleos endospermáticos; np: núcleos polares; N: nucelo; o: oófera; s: sinérgidas; Tee: tegumento externo; Tei: tegumento interno. Z: cigoto.

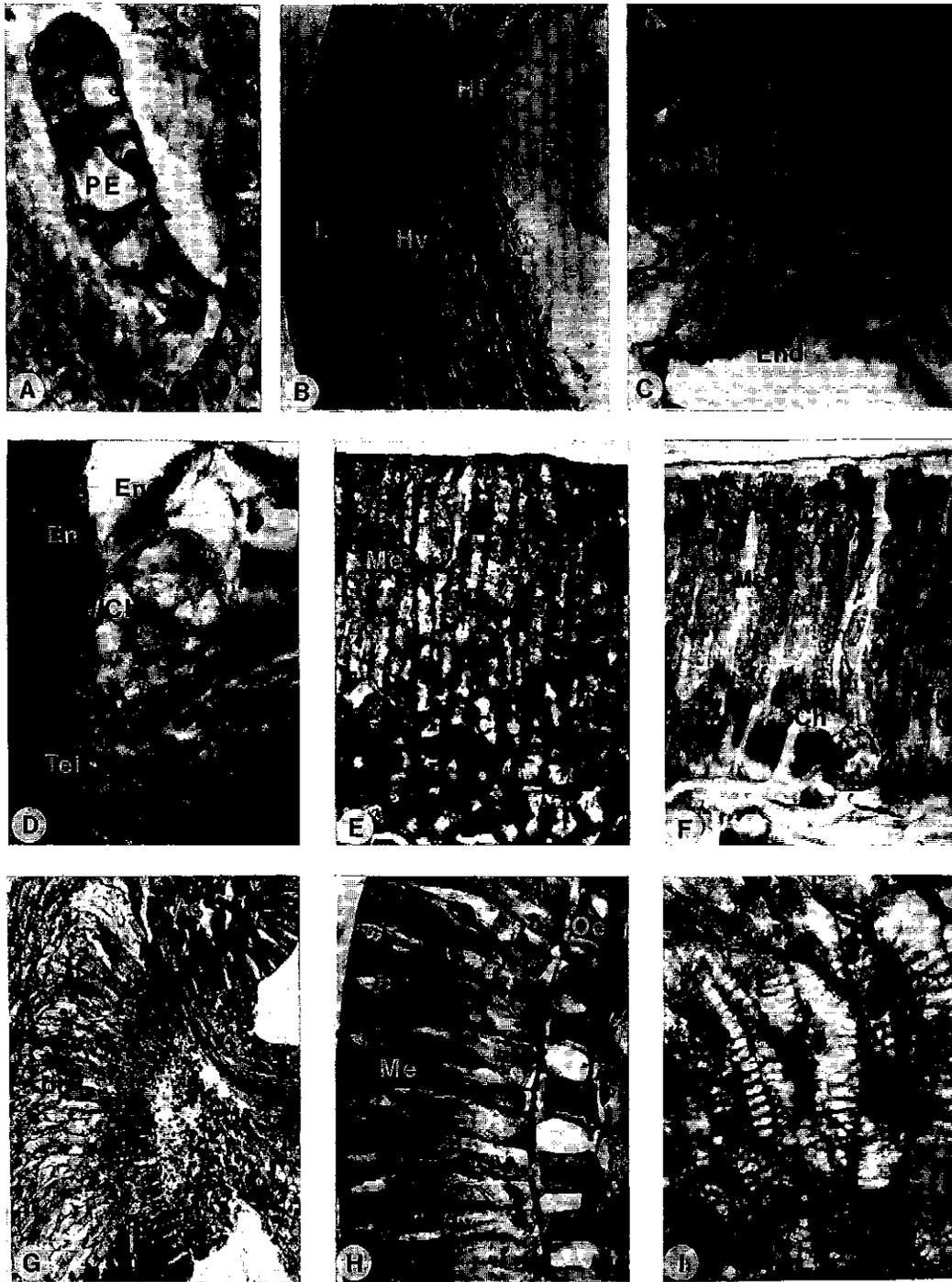


Figura 5. Embrión joven y caracteres de la semilla madura. A: proembrión, ca 570X. B: *S. leiocarpa*: lente y hipóstasis, ca 135X. C: hipóstasis, endosperma haustorial, ca 570X. D: célula basal del suspensor, ca 270X. E: *S. montevidensis*: macrosclereidas en el lente, ca 570X. F: *S. leiocarpa*: macrosclereidas en el lente, ca 570X. G: zona hilar de la semilla madura, ca 135X. H: cubierta de la semilla madura, ca 570X. I: traqueoides, ca 570X. Ae: astroesclereidas; bt: barra de traqueidas; Cb: célula basal del suspensor; Ch: células hipodérmicas en el lente; En: endotelio; End: endosperma; Hi: hipóstasis; Hv: haz vascular; L: lente; Me: macrosclereidas; N: nucelo; Oe: osteoesclereidas; PE: proembrión; Tei: tegumento interno.

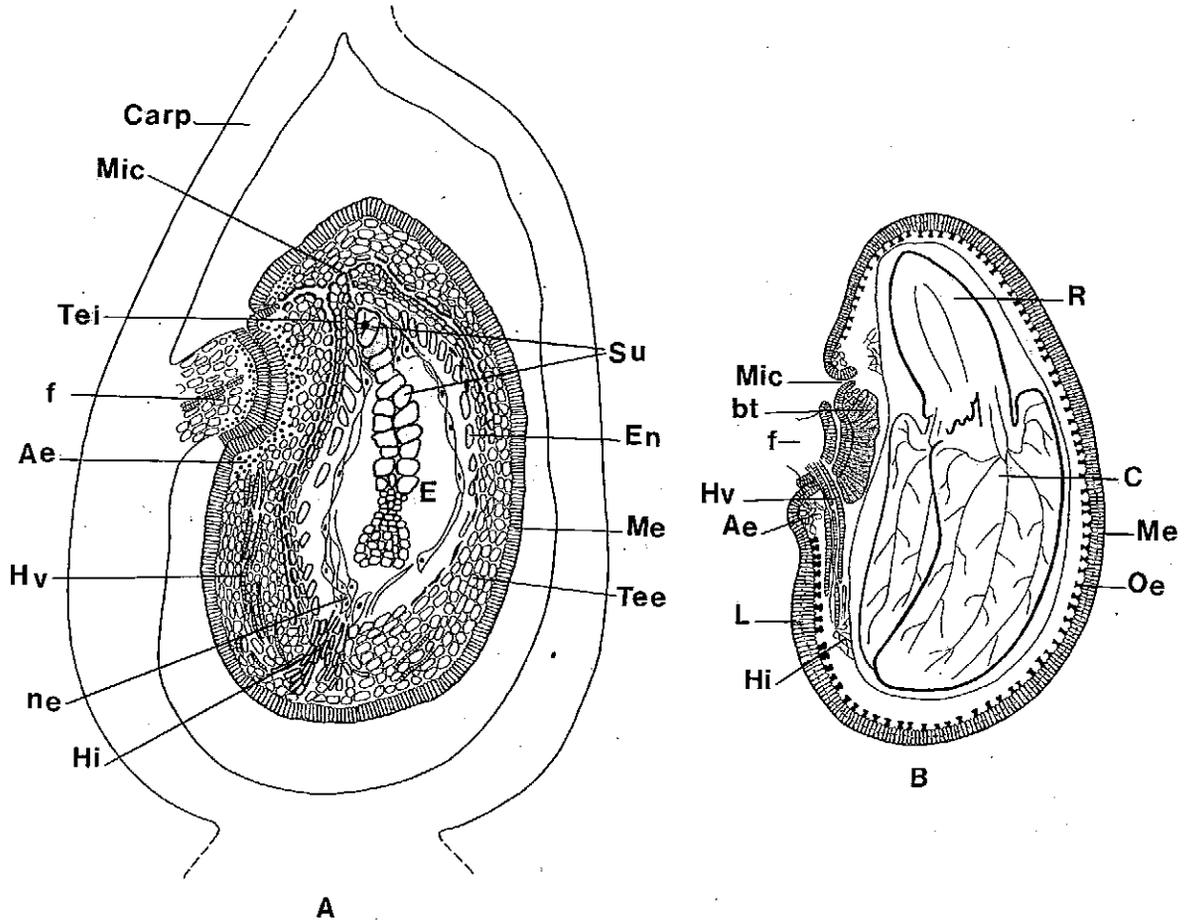


Figura 6. Esquemas de: A: Embrión joven (*S. leiocarpa*). B: Semilla madura (*S. montevidensis*). Ae: astroescleridas; bt: barra traqueidas; C: cotiledones; Carp: carpelo; E: embrión; En: endotelio; f: funículo; Hi: hipóstasis; Hv: haz vascular; L: lente; Me: macroesclereidas; Mic: micrópila; ne: núcleos endospermáticos; Oe: osteoesclereidas; R: radícula; Su: suspensor; Tee: tegumento externo; Tei: tegumento interno.

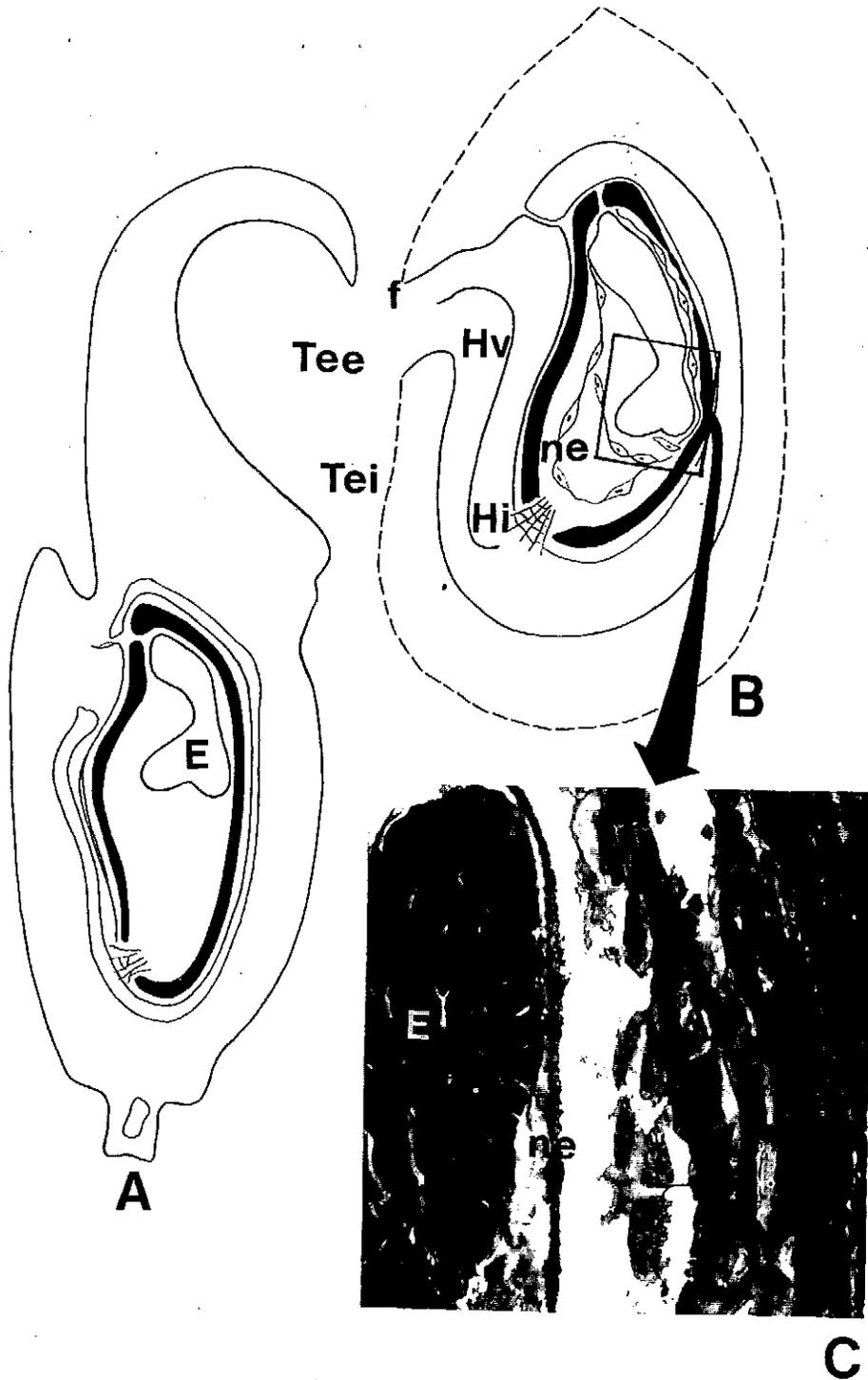


Figura 7. A y B: Esquemas de zona de contacto del embrión con el tegumento externo. C: Zona de contacto. E: embrión; f: funículo; Hi: hipóstasis; Hv: haz vascular; ne: núcleos endospermáticos; Tee: tegumento externo; Tei: tegumento interno.