

ONTOGENIA Y ANATOMÍA DE SEMILLA Y FRUTO EN *TILLANDSIA TRICHOLEPIS* (BROMELIACEAE)¹

LAILA MORRA², NILDA DOTTORI^{2,3} y MARÍA TERESA COSA^{2,3}

Summary: Seed and fruit ontogeny and anatomy in *Tillandsia tricholepis* (Bromeliaceae): The development and anatomy of seed and fruit of *Tillandsia tricholepis* are studied. The two outer layers of the mature seed coat, are detached in multicellular uniseriate filaments these ones contribute to the wind seed dispersal and to the fixation to the substrate. In the mature fruit, the pericarp is twisted and these movement support the exit of the seeds.

Key words: *Tillandsia tricholepis*, Bromeliaceae, seed, fruit, mechanism of adherence.

Resumen: Se analiza la ontogenia de la semilla y del fruto desde la flor en antesis hasta la madurez en *Tillandsia tricholepis*. En la semilla madura los 2 estratos externos del tegumento se separan en hebras multicelulares uniseriadas y la zona de unión de las células presentan articulaciones a modo de ganchos. El conjunto de estas hebras facilita la dispersión por el viento y cuando la semilla se clava en el sustrato contribuyen mediante sus ganchos al anclaje de la misma. El fruto es una cápsula de dehiscencia longitudinal el pericarpo maduro se retuerce y este movimiento sumado a la acción del viento contribuyen a la dispersión de las semillas.

Palabras clave: *Tillandsia tricholepis*, Bromeliaceae, semilla, fruto, mecanismo de adherencia.

INTRODUCCIÓN

Bromeliaceae es una familia neotropical con más de 2.000 especies que comprende 3 subfamilias: Pitcairnioideae, Bromelioideae y Tillandsioideae. En esta última, las semillas son pequeñas, livianas y dispersadas por el viento, la testa seminal es la más especializada de la familia (Boyd, 1932), diferenciándose una estructura "comosa" que le permite adherirse al sustrato, sea este una corteza, rocas, cables, etc.

Este grupo de plantas adquirió notable importancia debido a su efecto perjudicial sobre especies forestales, ornamentales y autóctonas, cuando el grado de invasión es grande (Fernández *et al.*, 1989). Según Benzing & Seemann (1978), la posición que ocupan dentro de la copa en árboles les permitiría interceptar e inmovilizar por largos períodos de tiempo sales minerales provenientes del huésped o del agua de lluvia; que de otro modo, quedarían disponibles para el árbol soporte. Debido a esto, los "cla-

veles del aire", son considerados "piratas de nutrientes", es decir hurtadores, en lugar de competidores por nutrientes.

Hay que destacar también el carácter "facultativo" de la relación que establecen estas Bromeliaceae epifíticas con el huésped, ya que el soporte puede ser orgánico o inerte.

Las características del tegumento seminal sólo han sido estudiadas en representantes de las subfamilias Pitcairnioideae y Bromelioideae (Varadarajan & Gilmartin, 1988; Rao & Wee, 1979), careciéndose de datos sobre el tema en Tillandsioideae. En esta subfamilia, se realizaron estudios sobre aspectos citológicos del eje radícula-hipocótilo en *T. flabellata* Baker y *T. schiedeana* Steud. (Cecchi Fiordi *et al.*, 1996). Por otra parte, Davis (1966) cita la presencia de poliembriónia en *T. juncea* (R. et P.) Leconte, particularidad que también fue señalada por Subils (1973) en otras 8 especies de *Diaphoranthema*, subgénero al que pertenece *T. tricholepis*.

Dado que la Provincia de Córdoba cuenta con aproximadamente el 50% del total de especies de *Tillandsia* que habitan en nuestro país (Subils, com. pers.) y siendo la semilla el principal modo de propagación, se consideró de interés estudiar los distintos estados de su desarrollo en *T. tricholepis*, con el propósito de conocer las modificaciones que experimenta el tegumento en relación a la dispersión y al mecanismo de adherencia al sustrato. Además, se

¹ Este trabajo es parte de la Tesina presentada por la primera autora, en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (U.N.C.), para optar al título de Bióloga.

² Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Avda. Vélez Sársfield 299, 5000 Córdoba, Argentina.

³ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). Casilla de Correo 495, 5000 Córdoba, Argentina. e-mail: dottori@imbiv.unc.edu.ar.

analiza el fruto desde estados jóvenes hasta su madurez como estructura relacionada con la protección y diseminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material estudiado procede de:

Argentina: Prov. Córdoba, Dpto. Capital, Parque Las Heras, Morra 50, 22-IV-98. Dpto. Colón, El Diquesito, Morra, Dottori & Cosa 4, 21-III-96; Villa Allende, Morra *et al.* 9, 12-V-96; Dpto. Tulumba, Rosario del Saladillo, Morra 35, 6-I-97 (CORD).

Se realizaron preparados permanentes de cortes seriados por flores en antesis, semillas y frutos, en sucesivos estados de desarrollo. El material fijado en FAA, fue deshidratado en una serie de alcohol etílico-xilol y luego incluido en "paramat". Los cortes de 10 a 15 μm de espesor se colorearon con hematoxilina activada y safranina contrastada con verde permanente (Conn *et al.*, 1960) o con azul de toluidina (Sakai, 1973).

Se aplicaron técnicas de maceración y diafanización (Johansen, 1940) en fruto y tegumento seminal.

Para la identificación de taninos se usó cloruro férrico al 10% con carbonato de sodio y una solución de sulfato ferroso con formol y agua destilada. Ambas reacciones dieron coloración azul oscuro o negro. La lignina se detectó con floriglucina y ácido clorhídrico al 25% y la celulosa con cloro-ioduro de zinc (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Para determinar cutina y grasas se utilizó Sudán IV y las proteínas se identificaron con eosina, ácido pícrico o ferrocianuro de potasio (Johansen, 1940).

Las fotomicrografías se tomaron con fotomicroscopio Axiophot y las fotomacrografías con microscopio estereoscópico Leica.

OBSERVACIONES

Características florales.- En *Tillandsia tricholepis* las flores constan de un perianto con tres sépalos verdes, soldados en el tercio basal, con denso indumento y por tres pétalos libres amarillos y glabros.

Al androceo lo forman seis estambres libres dispuestos en dos verticilos, que en longitud sobrepasan al gineceo. Las anteras son ditécicas y tienen dehiscencia longitudinal.

El gineceo es gamocarpelar con tres carpelos, el ovario súpero es trilocular, con 3 placentas que se desarrollan en los dos tercios basales del ovario (Fig. 1 A), conteniendo unos 46 a 57 óvulos por flor.

Ontogenia y estructura de la semilla.- Los óvulos son anátropos, bitégmicos y crasinucelados (Fig. 1 B). Cuando la flor está en antesis, los 2 tegumentos constan, cada uno de 3 estratos de células algo comprimidas radialmente y de tamaño más o menos uniforme (Fig. 1 C). El obturador es de origen placentario y está formado por tricomas uní y pluricelulares. El saco embrionario (Fig. 1 B), de tipo *Polygonum*, está limitado en la zona calazal por una hipóstasis de células pequeñas más o menos isodiamétricas y de paredes no lignificadas.

En los primeros estados de desarrollo de la semilla se produce un notable alargamiento de las células funiculares y del tegumento externo, especialmente en la zona micropilar. En la caliptra nucelar persisten células alargadas de tamaño relativamente uniforme.

Se observan hasta 3 proembriones, todos en estado globular; éstos parecen originarse de células derivadas del cigoto (posiblemente del suspensor), pero no se descarta la posibilidad de que algunos de ellos se originen de las sinérgidas o de células de la caliptra nucelar. El endotelio, presenta células taníferas prismáticas, comprimidas radialmente y de tamaño variable (Fig. 1 D).

La semilla madura es fusiforme de aproximadamente 3 mm de long. por 0,3 mm de lat., de color castaño. En la zona calazal persisten restos de endosperma con células de forma poligonal, conteniendo proteínas y lípidos (Fig. 2 A, B).

El embrión presenta un área especial denominada "zona de constricción", en la región media del eje radícula-hipocótilo; esta zona posee células de forma muy irregular, paredes onduladas, engrosadas y sin contenido citoplásmico (Fig. 2 C). El tegumento interno consta del endotelio tanífero y 1 estrato de células con paredes radiales desigualmente engrosadas y tangenciales onduladas. Este tegumento se prolonga en la zona micropilar y forma una punta con la que se clava en el sustrato, permitiendo su fijación (Fig. 3 A-C). De los 3 estratos del tegumento externo, el más interno permanece íntegro y adherido al tegumento interno, en tanto que los 2 externos se alargan hasta alcanzar, junto con el funículo, una longitud de ± 16 mm (unas 3 veces más largo que la porción de semilla que contiene al embrión); siendo sus células en la zona calazal de $\pm 0,30$ mm, en la

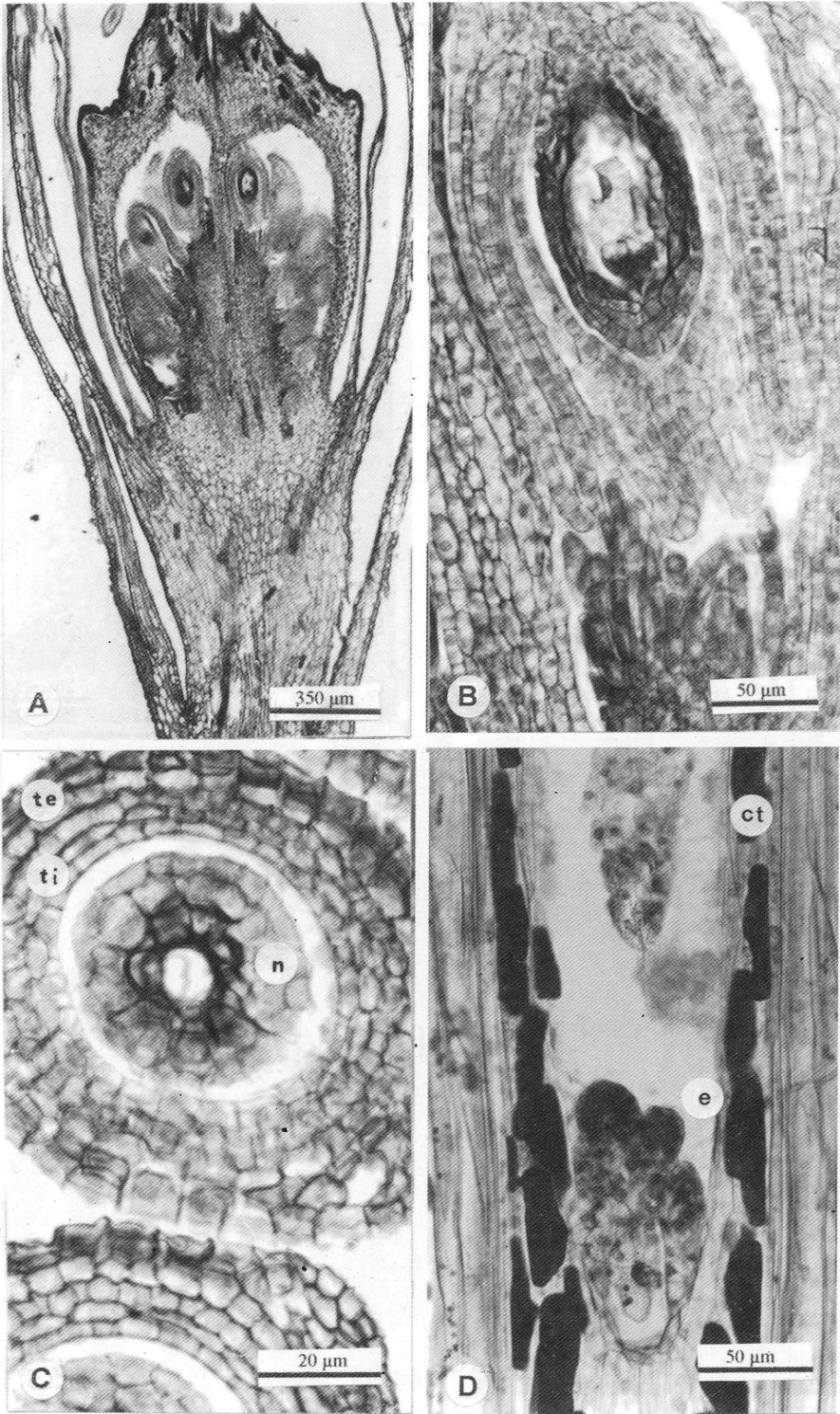


Fig. 1: Fotomicrografías tomadas con microscopio óptico. **A:** Sector de corte longitudinal por flor en antesis a la altura del ovario; **B:** detalle de un corte longitudinal por óvulo conteniendo al saco embrionario maduro; **C:** detalle de corte transversal por óvulo de flor en antesis; **D:** detalle mostrando 3 embriones en estado globular ubicados en zona micropilar. *Abreviaturas:* te, tegumento externo; ti, tegumento interno; n, nucela; ct, células taníferas; e, embrión.

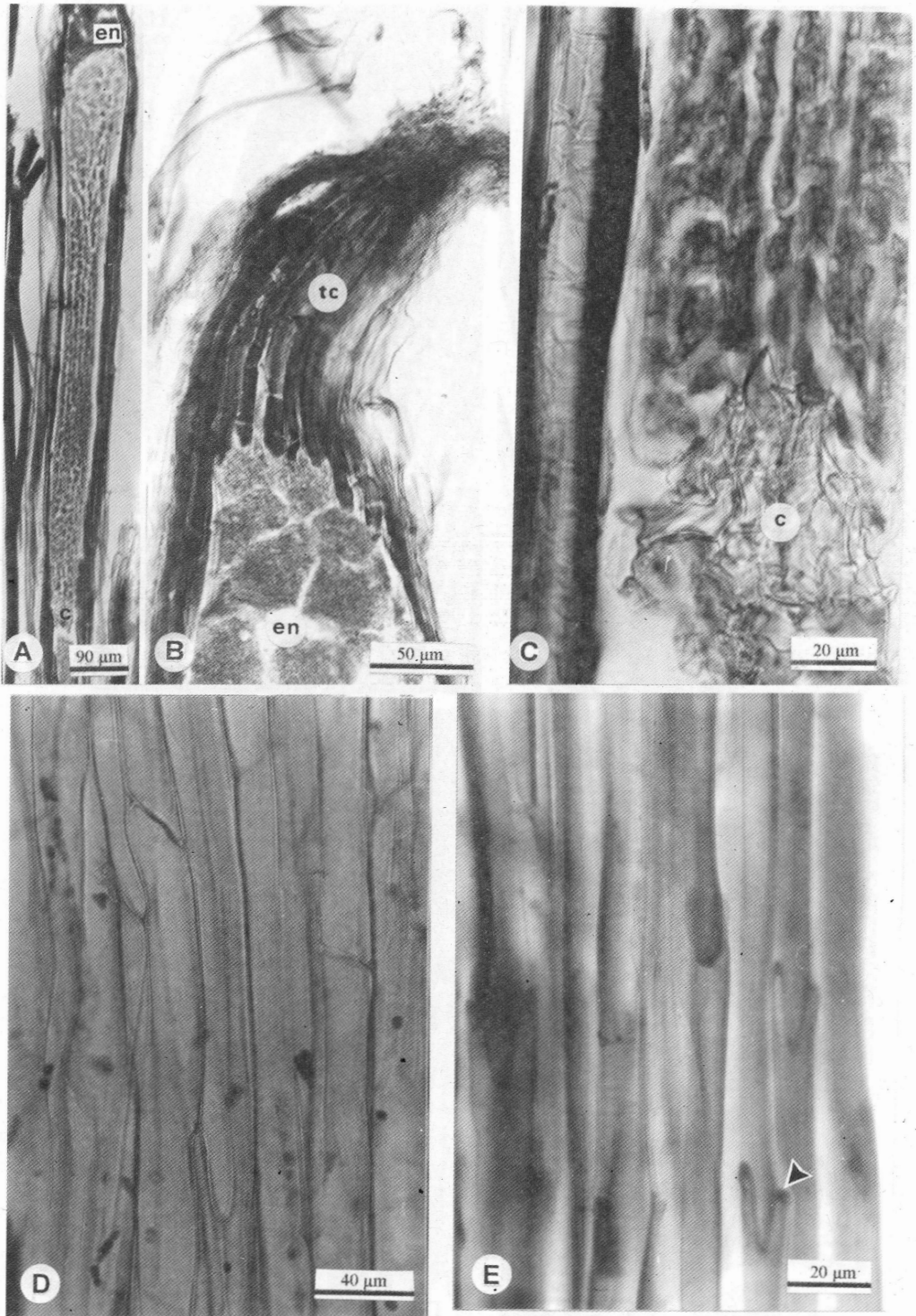


Fig. 2: Fotomicrografías tomadas con microscopio óptico. A: Corte longitudinal por semilla, se observa el embrión desarrollado, quedando en la zona calazal restos de endosperma; B: detalle en corte longitudinal de la zona calazal de la semilla, mostrando deposición de taninos y células del endosperma; C: detalle de zona de constricción; D: vista superficial de sector del tegumento externo joven; E: vista superficial de un sector del tegumento externo maduro; con cabeza de flecha se señalan las articulaciones a modo de gancho. *Abreviaturas:* tc, tegumento en zona calazal; en, endosperma; c, zona de constricción.

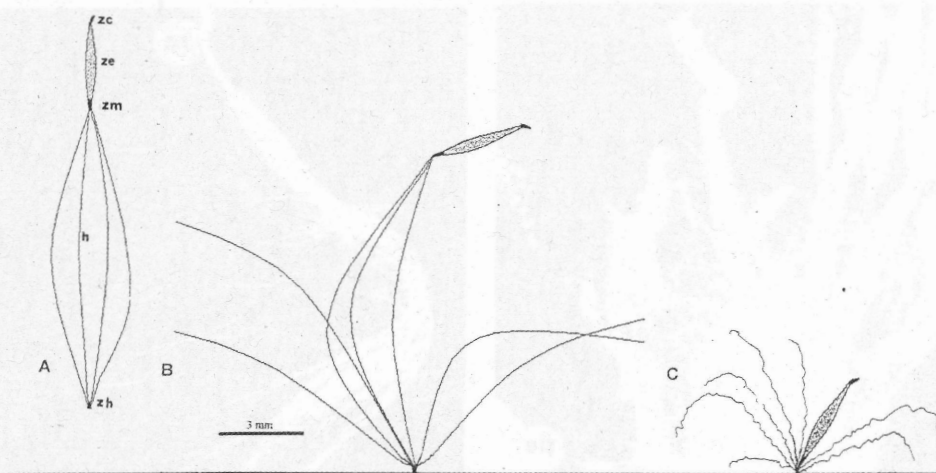


Fig. 3: Representación esquemática de la semilla madura y el despliegue de las hebras formadas por células tegumentarias en el momento de la dispersión y su adherencia al sustrato. Señalado con línea inferior. *Abreviaturas:* zc, zona calazal; zm, zona micropilar; zh, zona hilar; h, hebras; ze, zona que contiene al embrión.

región media de $\pm 0,50$ mm y en la micropilar de ± 1 mm. Posteriormente esas 2 capas se disgregan en "hebras" multicelulares uniseriadas, desde la zona calazal (Figs. 3 A, B; 4 B, D) permaneciendo unidas en la zona micropilar.

Las semillas son dispersadas por el viento, las "hebras" de aspecto sedoso, se desprenden del resto de la testa. La conexión intercelular, en el extremo de cada célula, en estados jóvenes es inicialmente recto a ligeramente curvo (Fig. 2 D) mientras que en la semilla madura, tiene forma de "articulación" y presenta saliencias a modo de ganchos, los que facilitan junto con la punta micropilar la adhesión de la semilla al sustrato (Figs. 2 E; 3 C; 4 C-D), y ayudan a la porción que contiene al embrión a clavarse en el mismo, las hebras contribuyen a mantener la humedad necesaria para la germinación (Fig. 3 C). Un 11% de semillas poseen de 2 a 3 embriones de distintos tamaños, aunque todos agrupados en la zona micropilar. Todas las semillas son semejantes entre sí, en aspecto y tamaño, independiente del número de embriones que contienen.

Ontogenia y anatomía del fruto. - El fruto es una cápsula septicida, cilíndrica, mide unos 15-21 mm long. por 1 mm lat. y está rodeado por el cáliz persistente.

Durante la antesis, la pared del ovario en su base está constituida por la epidermis externa unistrata con células comprimidas radialmente, el mesofilo con 4 ó 5 estratos de células parenquimáticas de forma y tamaño relativamente uniformes, y la epidermis interna con igua-

les características que la externa (Fig. 5 A). En la zona apical del ovario, el mesofilo tiene un estrato menos.

Después de la fecundación, el epicarpo unistratificado forma una gruesa cutícula, el mesocarpo consta de 3 ó 4 estratos y el único estrato del endocarpo posee células semejantes a fibrosclereidas con paredes radiales y tangencial interna engrosadas (Fig. 5 D). Durante el estado de proembrión globular, estas características del pericarpo se mantienen (Fig. 5 B-C).

En el fruto maduro, el epicarpo presenta células alargadas con paredes algo onduladas; en el mesocarpo pueden persistir 2 ó 3 estratos celulares y el endocarpo a la altura del hacecillo dorsal del carpelo, posee células alargadas semejantes a fibrosclereidas (Fig. 5 E), éstas se acortan hacia los septos, donde son casi isodiamétricas. Los engrosamientos, ya presentes desde el estado joven, se lignifican. En la zona de dehiscencia a nivel de los septos (Fig. 5 D), pueden persistir 1 ó 2 estratos parenquimáticos de células comprimidas radialmente.

Los frutos a la madurez quedan muy expuestos debido al alargamiento de los escapos; cuando el fruto se abre por un proceso de deshidratación, las semillas forman un manojo en el centro. La dehiscencia se inicia a nivel de la sutura ventral del carpelo y luego se separan longitudinalmente los septos. El pericarpo se retuerce y este movimiento sumado a la acción del viento contribuyen a la dispersión de las semillas (Fig. 4 A).

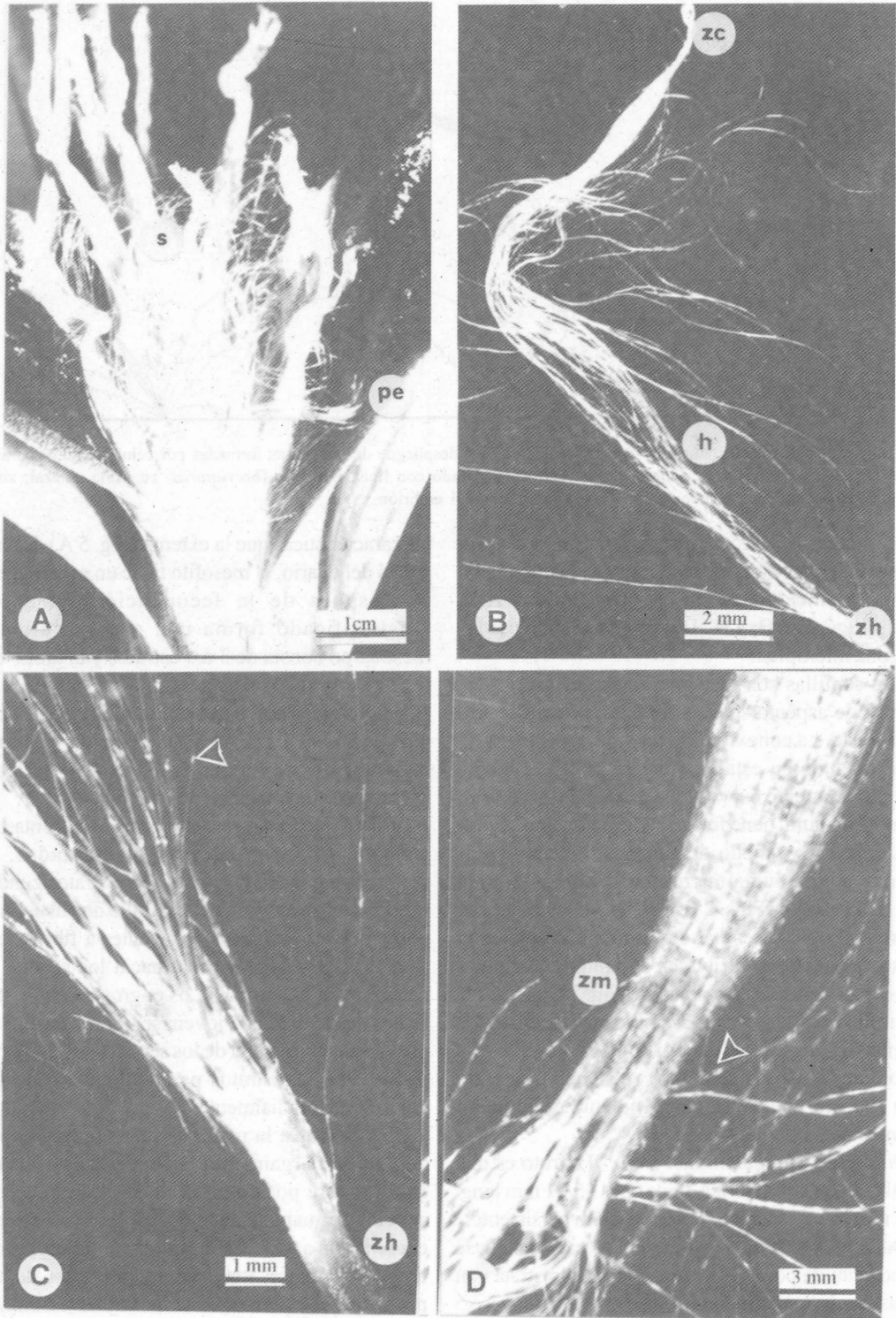


Fig. 4: Fotomacrografías tomadas con microscopio estereoscópico. **A:** Fruto maduro dehiscente, con semillas maduras en su interior; **B:** semilla madura con hebras y zona hilar; **C:** detalle de la zona hilar, con hebras soldadas; **D:** detalle del tegumento seminal que protege al embrión. En **C** y **D:** se señalan con cabeza de flecha las articulaciones a modo de gancho. *Abreviaturas:* s, semillas; pe, pericarpio; zc, zona calazal; zm, zona micropilar; zh, zona hilar; h, hebras.

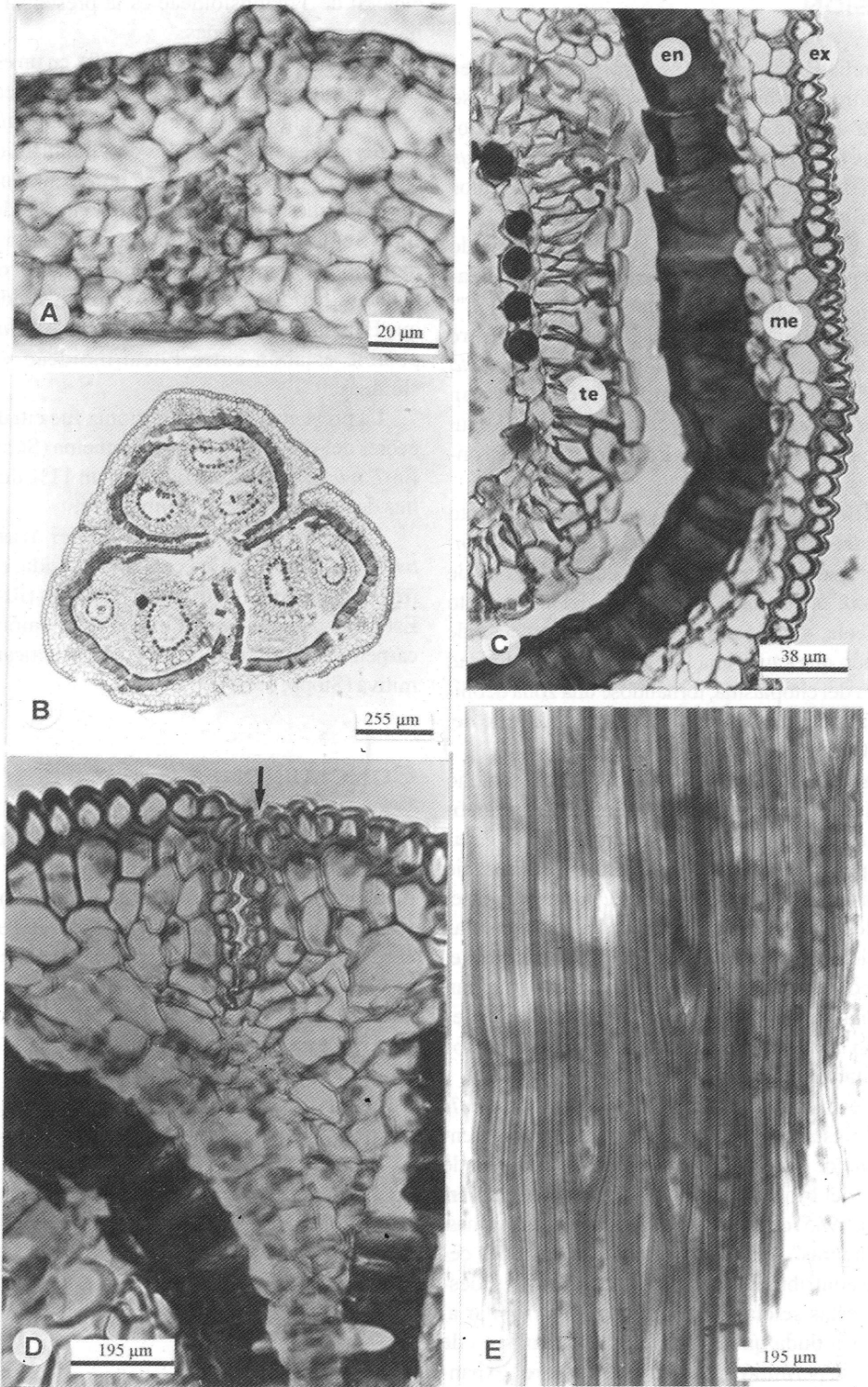


Fig. 5: Fotomicrografías tomadas con microscopio óptico. **A:** Sector de corte transversal por carpelo, de flor en antesis; **B:** corte transversal por fruto joven; **C:** detalle del pericarpio y tegumento seminal jóvenes; **D:** detalle en corte transversal de la zona de dehiscencia, marcada con flecha; **E:** vista superficial de un sector del endocarpo, en la parte media del carpelo. *Abreviaturas:* en, endocarpo; ex, exocarpo; me, mesocarpo; te, tegumento seminal.

DISCUSIÓN

La familia Bromeliáceas se caracteriza por tener óvulos anátropos y bitégmicos (Johri, 1992) como se halló en la especie acá estudiada. Por el contrario, Rao & Wee (1979), encontraron en *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromelioideae) que de 3 a 9% de los óvulos eran ortótropos y generalmente unitégmicos.

Según Cecchi Fiordi *et al.* (1996) el embrión de *Tillandsia* posee, en la región media del eje radicularhipocótilo, la denominada "zona de constricción". Esta presenta algunas diferencias anatómicas entre las distintas especies; mientras que, en *T. flabellata* Bak. y *T. schiedeana* Steud. las células son isodiamétricas y de paredes rectas, en la especie aquí analizada, son de forma muy irregular y paredes onduladas.

Según Brighigna *et al.* (1986), el escaso crecimiento de la radícula en varias especies atmosféricas de *Tillandsia*, igual que en *T. tricholepis* se debe a la zona de constricción; ésta sería la responsable del aislamiento de la radícula, ya que allí se produce un proceso de suberización que causa una lenta y reducida actividad metabólica del citoplasma, tornándose una zona debilitada y de abscisión, que separa la radícula del resto del embrión (Cecchi Fiordi *et al.*, 1996).

En la semilla madura de *T. tricholepis*, el endotelio posee células alargadas tangencialmente con depósito de taninos, lo mismo fue observado en *Ananas comosus* por Rao & Wee (1979), pero en esta especie las células se alargan radialmente. A su vez en el tegumento externo dichos autores hallaron células comprimidas impregnadas de taninos; mientras que, en la especie aquí estudiada, estas células se alargan longitudinalmente y lignifican, las paredes radiales se pliegan a modo de articulaciones con ganchos que facilitan la adherencia al sustrato.

La presencia de taninos en la semilla de *T. tricholepis*, estaría relacionada con la resistencia frente al ataque de hongos u otros patógenos, además de protegerla del frío y de la desecación ya que en invierno (Swain, 1965) comienza la dispersión de las mismas.

Las "hebras", tienen articulaciones entre las células que contribuyen al anclaje de las semillas, después que éstas se clavan con la punta micropilar al sustrato. Sin duda que este eficiente mecanismo de dispersión le permitió a los "claveles del aire" expandirse y colonizar diversos ambientes tropicales y subtropicales. Según Benzing (1990), una característica

general de Tillandsioideae es la presencia de semillas plumosas pequeñas.

Varadarajan & Gilmartin (1988), en un estudio sobre morfología de semillas de Pitcairnioideae, observaron que algunas especies de *Brocchinia* poseen ciertos rasgos similares a los de Tillandsioideae, (por ej., *B. tatei* L. B. Smith, tiene un mechón de apéndices filiformes o plumosos en un extremo de la semilla). Según estos autores han ocurrido cambios morfológicos similares (paralelos) en la evolución de las semillas de *Brocchinia* y Tillandsioideae, aunque Benzing *et al.* (1985) postulan a *Brocchinia* como posible eslabón entre Pitcairnioideae y Tillandsioideae.

La presencia de poliembrionía fue citada en 8 especies del subgénero *Diaphoranthema* (Subils, 1973). En *T. tricholepis* se encontró en un 11% de las semillas de cada fruto, 2 y 3 embriones.

La dehiscencia septicida del fruto, en *T. tricholepis*, se combina con la ventricida, como ocurre con frecuencia en frutos dehiscentes (Roth, 1977). Este tipo de dehiscencia indica floja unión entre los carpelos (Zimmerman, 1959) y filogenéticamente primitiva (Stopp, 1950).

CONCLUSIONES

Las particularidades estructurales de las semillas y de sus frutos en *T. tricholepis* ponen en evidencia un efectivo mecanismo de dispersión de las semillas y adhesión de las mismas al sustrato, lo cual es concordante con el carácter invasor de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Subils por la determinación del material estudiado, a la Biól. Adriana Pérez por la ayuda en técnicas histológicas y al Consejo de Investigaciones de la Provincia de Córdoba (CONICOR) por el apoyo económico brindado.

BIBLIOGRAFÍA

- BENZING D. H. 1990. *Vascular Epiphytes General biology and related biota*. Cambridge University Press, Cambridge

L. Morra et al., Ontogenia y anatomía de semilla y fruto en *Tillandsia tricholepis* (Bromeliaceae)

- BENZING, D. H. & J. SEEMANN. 1978. Nutritional piracy and host decline: a new perspective on the epiphyte-host relationship. *Selbiana* 2: 133-148.
- BENZING D. H, T. J. GIVNISH & D. BERMUDEZ. 1985. Absorptive trichomes in *Brocchinia reducta* (Bromeliaceae) and their evolutionary and systematic significance. *Syst. Bot.* 10: 81-91. (Obra no vista, citada por VARADARAJAN & GILMARTIN, 1988).
- BOYD, L. 1932. *Monocotylus Seedlings. Morphological studies in the Post-seminal development of the embryo.* Societas Botánica, Edinburgh.
- BRIGHIGNA, L., A. CECCHI FIORDÍ & M. R. PALANDRI. 1986. Primi risultati di una inadagine sull'apparato radicae del género *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Giorn. Bot. Ital.* 120: 96. (Obra no vista, citada por CECCHI FIORDI et al., 1996).
- CECCHI FIORDI, A., M. R. PALANDRI, P. DI FALCO & G. TANI. 1996. Cytological aspects of the hypocotyl correlated to the behavior of the embryo radicle of *Tillandsia* atmospheric species. *Caryologia* 49: 113-124.
- CONN, H. J., M. A. DARROW & V. M. EMMEL 1960. *Staining procedures.* Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- D'AMBROGIO de ARGÜESO, A. 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal.* Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- DAVIS, G. L. 1966. *Systematic Embryology of the Angiosperms.* John Wiley & Sons, New York.
- FERNANDEZ, L. V., J. BELTRAMO & D. O. CALDIZ. 1989. Germinación y longevidad de semillas de *Tillandsia recurvata* L. *Revista Fac. Agrón. Univ. Nac. La Plata* 65: 81-85.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique.* McGraw-Hill Book Co., New York.
- JOHRI, B. M., K. B. AMBEGAOKAR & P. S. SRIOVASTAVA. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms.* 2. Spring-Verlag, Berlin.
- RAO, A. & Y. C. WEE. 1979. Embryology of the pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. *New Phytol.* 83: 485-497.
- ROTH, I. 1977. Fruits of Angiosperms. In: LINSBAUER K. (ed.), *Handbuch der Pflanzenanatomie*, 10. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- SAKAI, W. 1973. Simple Method for differential staining of Paraffin embedded plant material using Toluidine blue O. *Stain Technol.* 48: 347-349.
- STOPP, K. 1950. Karpologishe Studien I and II. *Abh. Akad. Wiss. Lit. Mainz Math-Nat. Kl.* 7: 165-218. (Obra no vista, citada por ROTH, 1977)
- SUBILS, R. 1973. Poliembrionía en especies argentinas de *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Kurtziana* 7: 266-267.
- SWAIN, T. 1965. The tannins. In: BONNER, J. & J. VARNER (eds.), *Plant Biochemistry*, pp. 552-580. Academic Press, New York.
- VARADARAJAN, G. S. & A. J. GILMARTIN. 1988. Seed morphology of the subfamily *Pitcairnioideae* (Bromeliaceae) and its systematic implications. *Amer. J. Bot.* 75: 808-818.
- ZIMMERMAN, W. 1959. *Die Phylogenie der Pflanzen.* G. Fischer, Stuttgart (Obra no vista, citada por ROTH, 1977).

Recibido el 26 de Agosto de 2002, aceptado el 11 de noviembre de 2002.