

MORFOLOGÍA Y ESPOROGÉNESIS EN FLORES AÉREAS Y SUBTERRÁNEAS DE LA ESPECIE ANFICÁRPCA *TRIFOLIUM POLYMORPHUM* (FABACEAE, PAPILIONOIDEAE)

GABRIELA SPERONI¹ y PRIMAVERA IZAGUIRRE DE ARTUCIO²

Summary: Morphology and sporogenesis in aerial and underground flowers of the amphicarpic species *Trifolium polymorphum* (Fabaceae, Papilionoideae). *Trifolium polymorphum* is a winter stoloniferous perennial legume which occurs in Argentina, south of Brazil, Paraguay, central Chile and Uruguay. It is peculiarly amphicarpic and produces two types of fruits: in the aerial flowers (clustered in capitula) 1-2 (4)-seeded legumes, and in the underground flowers (gathered in loose bundles around the plant collar) globose 2-seeded indehiscent fruits. This character renders *Trifolium polymorphum* an interesting biological model for the study of reproductive processes. A comparative morphological and embryological study of two types of flowers is presented in this paper. Aerial flowers are papilionaceous and underground flowers have highly modified floral whorls. Both flower types have bisporangiate anthers, secretory tapetum, and a developed endothecium. The latter, however, has lost functionality in underground flowers, so that pollen tubes grow through the anther wall towards the stigma. Microspore tetrads are tetrahedral with simultaneous cytokinesis. Some irregularities occur during meiosis, such as differences in the size of the microspores and formation of micronuclei. Ovules are campilotropous, crassinucelate, bitegmic, and have a zig-zag micropyle. Embryo sac development is *Polygonum* type. Pollen tubes have been analysed with the aid of two methods: fluorescence microscopy using methyl blue stain and with α -naphthyl acetate viewed with a stereoscopic microscope. Both flower types showed pollen tube growth on their own stigma.

Key Words: *Trifolium polymorphum*, Fabaceae, amphicarp, embryology, cleistogamy.

Resumen: *Trifolium polymorphum* es una leguminosa perenne, invernada y estolonífera, que habita en Argentina, sur de Brasil, Paraguay, centro de Chile y Uruguay. Es una especie anficárpica: en las flores aéreas, agrupadas en cabezuelas, produce legumbres 1-2 (4) seminadas y en las flores subterráneas, agrupadas en manojos axilares, produce frutos indehiscentes globosos 2-seminados. Esta característica hace que *T. polymorphum* sea un modelo biológico muy interesante para el estudio de procesos reproductivos. El presente trabajo plantea el estudio comparativo de la morfología y los estadios embriológicos que ocurren en ambos tipos de flores. Las flores aéreas tienen corola papilionácea y las flores subterráneas son altamente modificadas en sus verticilos florales. Ambos tipos de flores presentan anteras bisporangiadas, tapete secretor y endotecio desarrollado. Este último sin embargo, ha perdido su funcionalidad en las flores subterráneas y los tubos polínicos se desarrollan atravesando la pared de la antera, hasta alcanzar el estigma. Las tétradas de micrósporas son tetraédricas con citocinesis simultánea y se encuentran ciertas irregularidades durante la meiosis, tales como diferencias de tamaño de las micrósporas y formación de micronúcleos. Los óvulos son campilótropos, crasinucelados, bitégmicos y con micrópila en zig-zag. El desarrollo del saco embrionario es del tipo *Polygonum*. Los tubos polínicos se observaron con microscopía de fluorescencia, utilizando azul de metilo como colorante y en un microscopio estereoscópico, empleando α -naftil acetato como colorante. En ambos tipos de flores se observaron tubos polínicos creciendo sobre el estigma de su misma flor.

Palabras Clave: *Trifolium polymorphum*, Fabaceae, anficarpia, embriología, cleistogamia.

INTRODUCCIÓN

La distribución natural de *Trifolium polymorphum* Poir. abarca Argentina, sur de Brasil, Paraguay, centro de Chile y Uruguay (Burkart, 1987). Es una especie perenne estolonífera con fuerte raíz

napiforme, de ciclo invernal, que vegeta desde marzo o abril hasta diciembre, desapareciendo su parte aérea durante todo el verano. Habita tapices bajos, siendo eliminada por competencia entre los pastos altos sin pastoreo (Rosengurt, 1943, 1946). Se reconocen dos variedades: *T. polymorphum* var. *polymorphum* y *T. polymorphum* var. *grandiflorum* Parodi. Esta última se diferencia de la primera por tener flores aéreas mayores y agrupadas en cabezuelas paucifloras.

Trifolium polymorphum posee flores aéreas casmógamas de color rosado, agrupadas en cabezuelas

¹Asistente de Botánica

²Docente libre y ex Profesora Titular de Botánica del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Av. E. Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay. speronig@yahoo.com

axilares largamente pedunculadas, con baja producción de semillas y flores subterráneas cleistógamas, de color blanco, agrupadas en manojos axilares (Burkart, 1952), con buena producción de semillas. Si bien la floración aérea comienza en octubre-noviembre y fructifica en diciembre, las flores subterráneas aparecen en invierno (Burkart, 1987) y fructifican desde setiembre a diciembre.

En la cleistogamia, la polinización y consecuente fecundación, se producen con la flor cerrada y por lo tanto las semillas producidas son el resultado de un proceso de autogamia. Uphof (1938) señala que existen especies con cleistogamia ecológica, donde la producción de flores cleistógamas o casmógamas está condicionada por factores ecológicos y otras, con cleistogamia determinada genéticamente como ocurre en las especies anficárpicas, donde se forman ambos tipos de flores: las casmógamas aéreas y las cleistógamas subterráneas.

Se han descrito marcadas modificaciones en la morfología de los verticilos de las flores subterráneas, como reducción del número de piezas de los verticilos florales, pérdida de la coloración, ausencia de dehiscencia en las anteras, creciendo los tubos polínicos a través de la pared de la antera, hasta alcanzar el estigma (Uphof, 1938). Las flores cleistógamas de *T. polymorphum* han sido descritas por su morfología externa, como flores globosas de color blanco (Burkart, 1952, 1987; Izaguirre, 1995) pero su morfología interna y el grado de modificación que pueden presentar no han sido observados.

Existe una treintena de especies anficárpicas en el mundo (Fevereiro-Barbosa, 1987) y esta condición se presenta en varios géneros de leguminosas como *Vicia*, *Amphicarpa*, *Vigna*, *Trifolium* (Rivals, 1953) y *Macroptilium* (Fevereiro-Barbosa, 1987). Las flores cleistógamas de las especies anficárpicas citadas hasta el momento son autógamas, no detectándose apomixis en ninguno de los casos. Las flores aéreas de *T. polymorphum* han sido citadas como alógamas (Coll & Zarza, 1992) y sus caracteres morfológicos hacen pensar en flores polinizadas por insectos. Sin embargo es frecuente encontrar autogamia en leguminosas cultivadas que presentan flores de tipo entomófilo (Frankel & Galum, 1977).

El presente trabajo tiene como objetivo analizar y comparar la morfología de las flores aéreas y subterráneas de *Trifolium polymorphum* y los procesos embriológicos que en ellas ocurren hasta el desarrollo del saco embrionario y formación de los granos de polen.

MATERIAL Y MÉTODO

La recolección de material de *T. polymorphum* var. *polymorphum* se realizó en una población ubicada entre los cerros Del Cuervo y Arequita, Dpto. Lavalleja, Uruguay. El material de herbario se depositó en el Herbario "Bernardo Rosengurt" de la Facultad de Agronomía de Montevideo (Speroni, Grela, MVFA 28072; Izaguirre, Speroni, Beyhaut, Bonifacino, MVFA 28800).

Se coleccionaron flores aéreas y subterráneas y se fijaron en FAA (formol, ácido acético y alcohol 70°, 5:5:90). El material se disecó y procesó para la técnica convencional de inclusión en parafina, previa deshidratación con alcohol etílico, usando toluol como intermediario. Los cortes se efectuaron con micrótopo de rotación Minot American Optical (7 a 12 μ m), se tiñeron con la doble coloración safranina - fast green y se montaron en Bálsamo de Canadá.

La observación de los preparados se realizó en microscopio óptico Leitz Wetzlar. Las fotomicrografías se tomaron en microscopio Nikon HFK-DX II, utilizando película color Fuji 100 ASA.

Para este estudio se trabajó con estadios florales determinados morfológicamente según se detalla en la Tabla 1 y Fig. 4. El material fue disecado, observado y dibujado utilizando lupa Nikon SMZ-10 con cámara clara. Las fotografías se tomaron en lupa Nikon AFX-IIA con cámara Nikon FX-35WA.

Se observaron tubos polínicos empleando la técnica de fluorescencia de Evans & Honey (1982) y Stone *et al.* (1984) (cf. Shivanna & Rangaswamy, 1992), usando azul de metilo como fluorocromo. Se observó y fotografió el material en un microscopio de fluorescencia Olympus Vanox AH-3. Adicionalmente, se observaron tubos polínicos utilizando α -naftil acetato como colorante. Esta técnica es utilizada para determinar la receptividad estigmática, porque detecta la actividad de esterases en el estigma (Pearse, 1972 en Dafni, 1992) y se constató que existe también tinción de los granos de polen y sus tubos polínicos. Se observó y fotografió el material en lupa Nikon AFX-IIA. Para documentar los resultados de estas últimas técnicas se usó película Kodak 400 ASA.

RESULTADOS

Morfología floral

Las flores aéreas están agrupadas en cabezuelas de 10 a 40 flores de aproximadamente 8 mm de longi-

Tabla 1. Estadios florales (an, anteras; C, corola; E, estandarte; K, cáliz; sg, estigma)

Flores aéreas			
Estadio	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Observaciones
1	2,0 - 2,25	0,75 - 0,8	K cubriendo totalmente la C.
2	2,5 - 3,5	1,0 - 1,25	K comienza a abrirse, C no visible.
3	3,0 - 4,0	1,25 - 1,5	Comienza a visualizarse la C.
4	5,0 - 5,5	1,25 - 1,75	K cubre la mitad de la corola.
5	6,0 - 7,5	1,75 - 2,0	Comienza a abrirse el E, dehiscencia de las an.
6	8,5 - 9,0	2,0 - 3,0	C abierta.

Flores subterráneas			
Estadio	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Observaciones
1			La flor no se diferencia de los pedicelos.
2	1,0 - 1,25	0,5	K cubre totalmente la C, an por debajo del sg.
3	1,25	0,75 - 1,0	K cubre totalmente la C, an próximas al sg.
4	1,25 - 1,5	0,75 - 1,0	K rasgado, an en contacto con el sg.

tud, con corola rosada y perfumada, intensificándose el color hacia la base de los pétalos (Fig. 1). La morfología de la corola es del tipo papilionáceo y tanto las alas como la quilla están adheridas al tubo estaminal. El androceo es diadelfo, está cubierto totalmente por la quilla y raramente las anteras asoman por encima de ésta. El ovario unicarpelar aloja 2 a 4 (5) óvulos de posición ventral. El estilo es curvado y se alarga a medida que se desarrolla la flor: en las primeras etapas (estadio 1 a 2) el estigma se encuentra a la misma altura que las anteras, luego el estilo se alarga con mayor rapidez que los filamentos y el estigma sobrepasa el nivel de las anteras (estadio 3 y 4) y finalmente los filamentos continúan alargándose y las anteras y el estigma quedan muy próximos, aunque el estigma aún las sobrepasa levemente (estadio 5 y 6) (Fig. 4). El estilo presenta un canal, que se comunica con el lóculo del ovario, pero que no alcanza el estigma (Fig. 2c). Dicho canal no presenta un recubrimiento celular definido y las células adyacentes a él parecen desprenderse.

El estigma es apical y presenta papilas con forma de "dedo de guante" tapizando la superficie.

En el estadio 5 se observó la presencia de una cutícula cubriendo las papilas (Fig. 2b).

Entre la base del ovario y la columna estaminal existe un nectario de color verde, poco evidente macroscópicamente. Comienza a diferenciarse en flores jóvenes del estadio 1, evidenciándose en los cortes anatómicos por la presencia de una epidermis de células altas que tapiza la base de los filamentos (Fig. 2a). En el estadio 3 se distingue un tejido nectarífero diferenciado, con células de menor tamaño, de citoplasma denso, núcleo grande y nucleolo poco prominente,

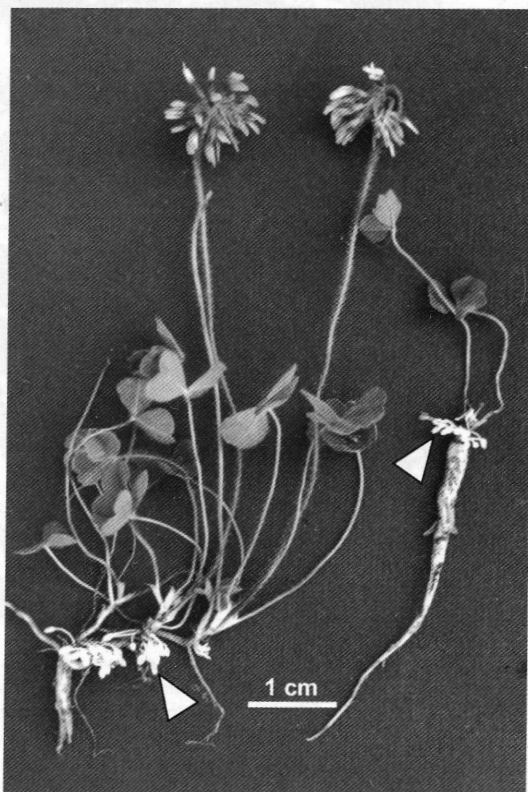


Fig. 1. Plantas de *Trifolium polymorphum* con flores aéreas y subterráneas (flechas).

que se ubica entre la base de los filamentos y la del ovario. Sin llegar vascularización directamente al nectario, la estela que ingresa a la base de la flor, se ramifica en el receptáculo, inervando los diferentes verticilos. En los filamentos de los estambres penetran las ramificaciones que más se aproximan al nectario.

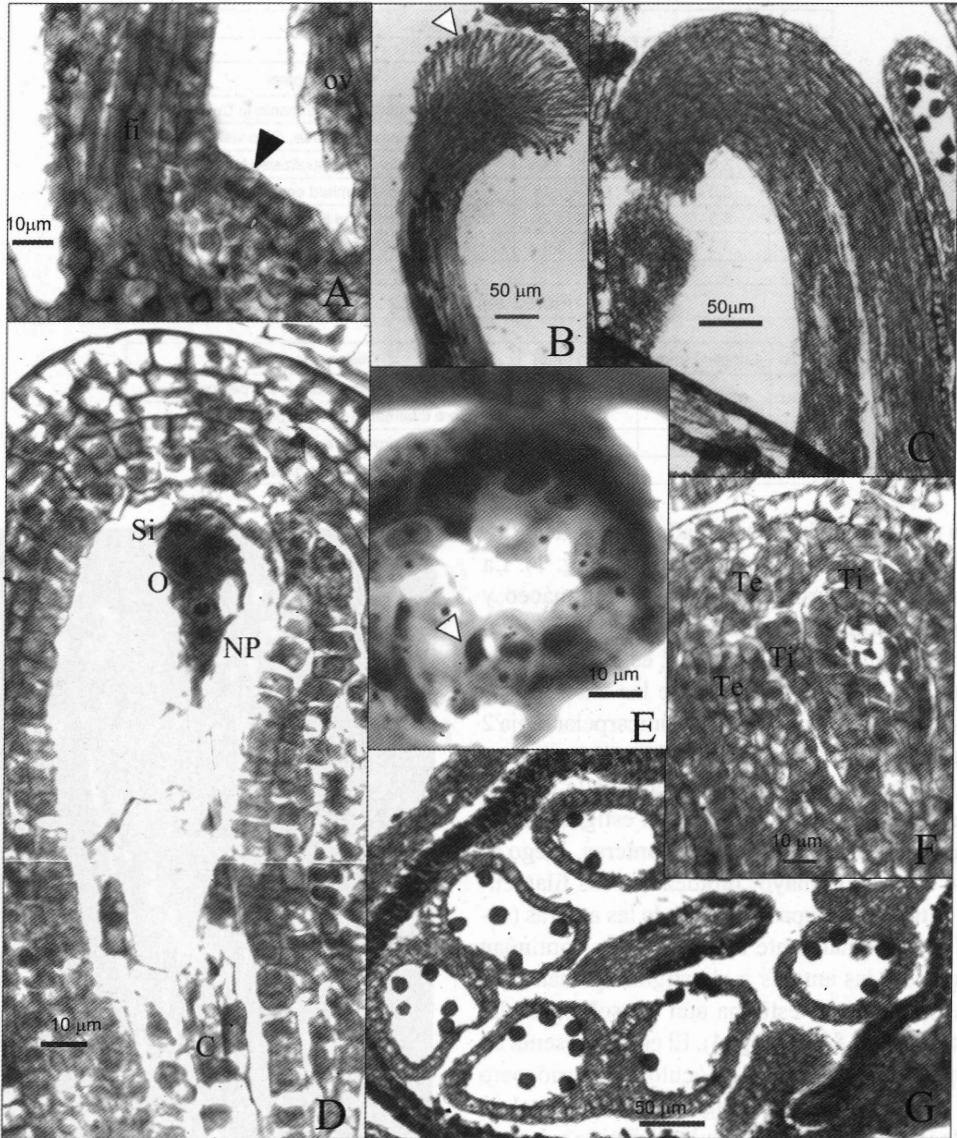


Fig. 2. Flores aéreas de *Trifolium polymorphum*. **A:** Corte longitudinal de nectario joven (estadio 1). La flecha señala la epidermis del nectario. **B:** Corte longitudinal de estigma papiloso. La flecha señala la cutícula del estigma. **C:** Corte longitudinal de estilo mostrando canal estilar. **D:** Corte longitudinal de saco embrionario. **E:** Corte transversal de antera con tétrada de micrósporas, algunas degeneradas (flecha). **F:** Corte longitudinal de óvulo con micrópila en zig-zag (estadio 3). **G:** Corte transversal de flor con anteras bisporangiadas. (C, células nucleares; fi, filamento; NP, núcleos polares; O, óosfera; ov, ovario; Si, sinérgidas; Te, tegumento externo; Ti, tegumento interno).

Las flores subterráneas están agrupadas en manojos axilares y son producidas desde julio-agosto hasta noviembre-diciembre, aún cuando la floración aérea se encuentra en su máximo pico de floración. Estas flores nacen desde los nudos del tallo, aún en aquellos donde se forman flores aéreas (Fig. 1). Los manojos presentan flores en distintos estadios de desarrollo, desde flores muy jóvenes (1,0 - 1,25 mm

de longitud) hasta flores ya fructificadas (1,5 - 2,0 mm de longitud).

Las flores subterráneas son blancas, pudiendo presentar a veces, algún tinte rosado pálido. Son flores muy modificadas, con cáliz blanco, engrosado y carnoso, que encierra la flor a modo de capuchón (Fig. 3a). La corola está reducida a tres pétalos: uno externo de mayor tamaño y ventral, que encierra a

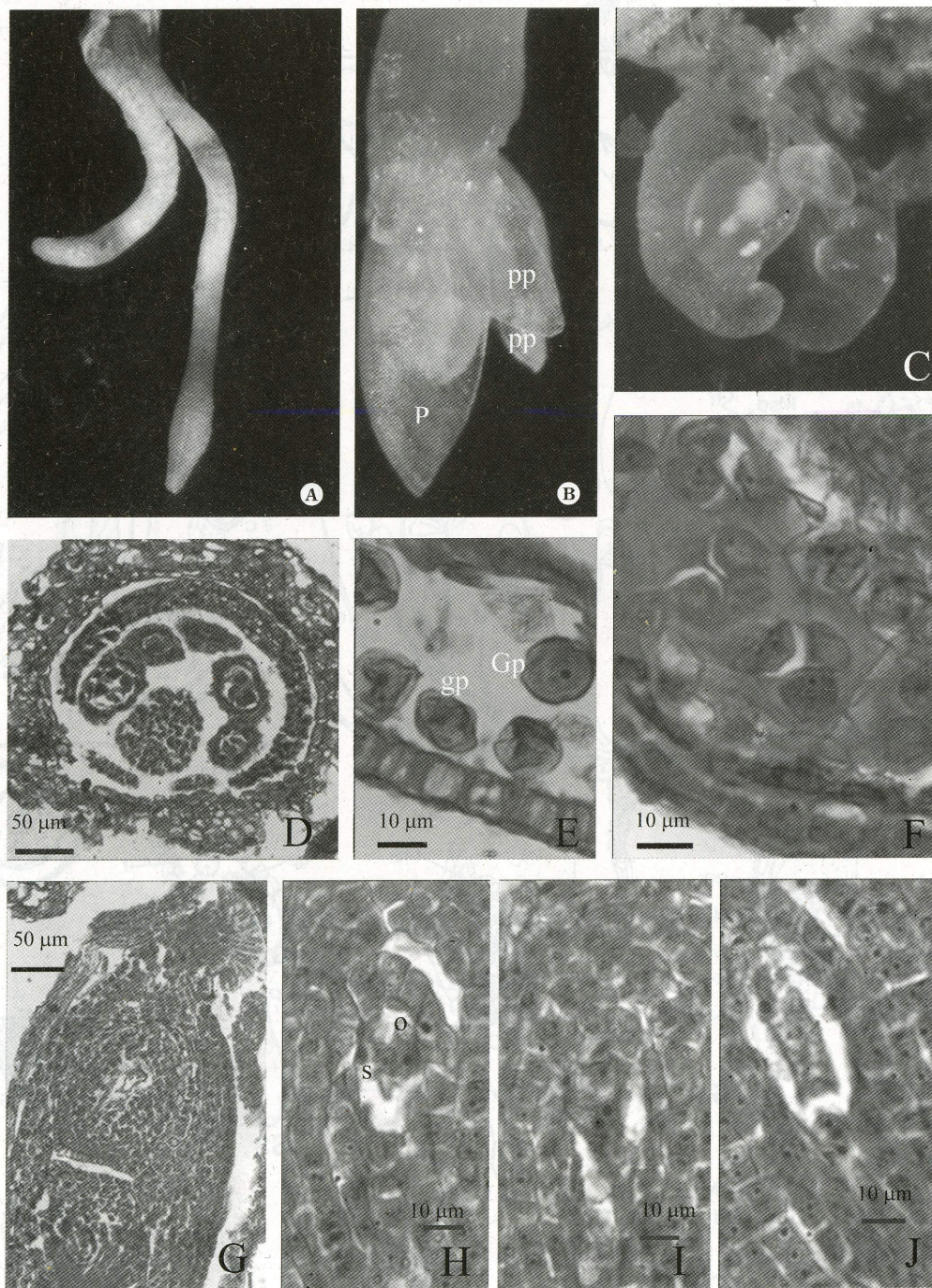


Fig. 3. Flores subterráneas de *Trifolium polymorphum*. **A:** Dos flores jóvenes cubiertas por el cáliz (a la izquierda estadio 1 y a la derecha estadio 2). **B:** Flor con cáliz removido, mostrando pétalo mayor (P) y pétalos menores laterales (pp). **C:** Flor con corola removida, mostrando gineceo y 3 estambres. **D:** Corte transversal de flor, mostrando anteras bisporangiadas. **E:** Corte longitudinal de antera madura con grános de polen maduros (Gp) y mal formados (gp). **F:** Corte longitudinal de antera (estadio 2) con tétradas tetraédricas de micrósporas. **G:** Corte longitudinal de gineceo con 2 óvulos, estigma papiloso y estilo sólido. **H, I, J:** Cortes longitudinales sucesivos de saco embrionario. **H:** Sinérgida (s) y oósfera (o). **I:** Oósfera y núcleos polares. **J:** 3 antípodas y núcleo polar.

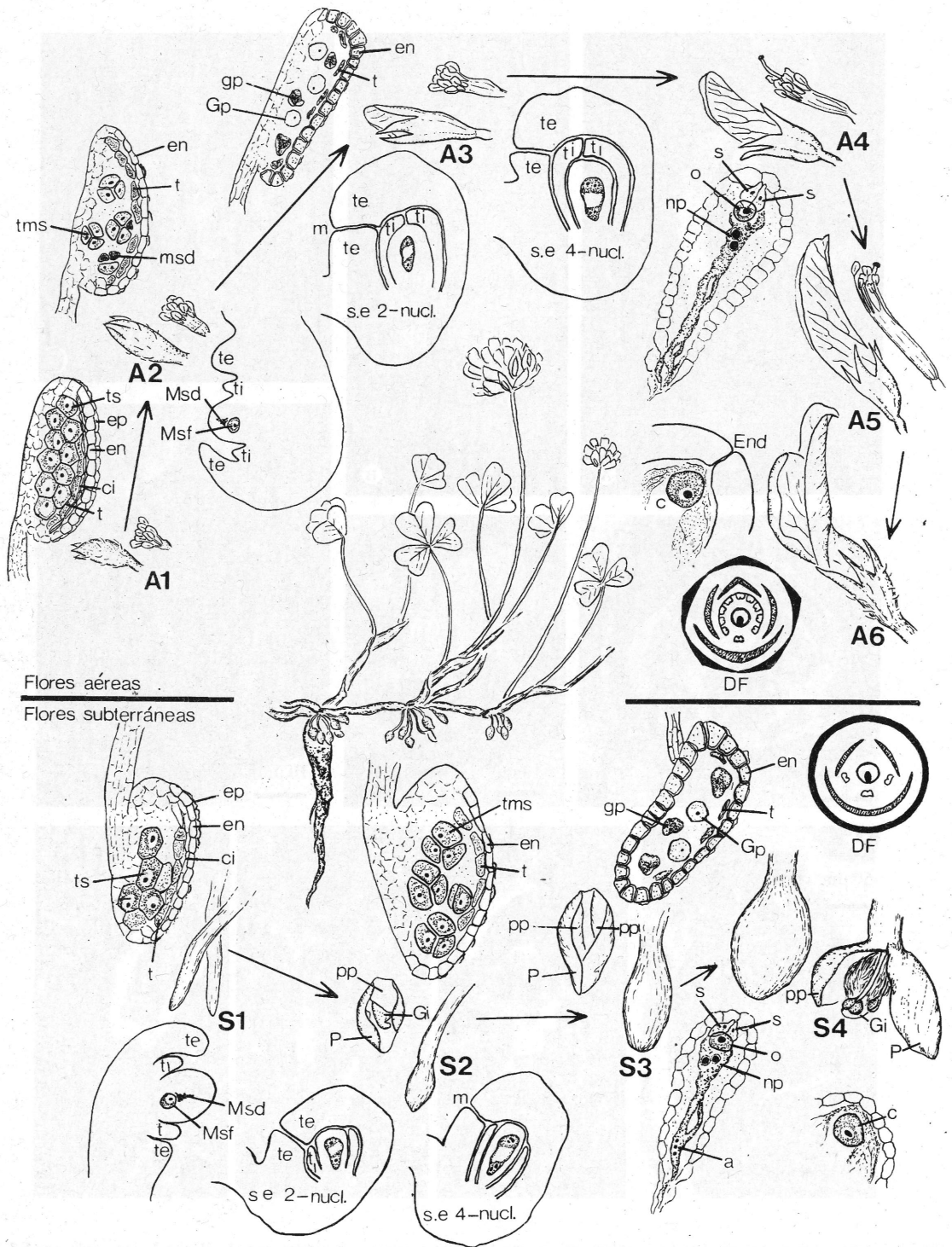


Fig. 4. Estadios florales de *Trifolium polymorphum* y procesos esporogénicos relacionados. A, estadios de las flores aéreas; S, estadios de las flores subterráneas; c, cigoto; ci, capas intermedias; DF, diagrama floral; en, endotecio; End, endostoma de la micrópila; ep, epidermis; Gi, gineceo; Gp, granos de polen maduros; gp, granos de polen mal formados; m, micrópila; msd, micrósporas degeneradas; Msd, megásporas degeneradas; Msf, megáspora funcional; np, núcleos polares; o, oófera; P, pétalo mayor; pp, pétalo menor; s, sinérgida; se, saco embrionario, t, tapete; te, tegumento externo; ti, tegumento interno; tms, tétrada de micrósporas; ts, tejido microsporogénico.

dos pétalos internos, de menor tamaño y laterales (Fig. 3b). El androceo está formado por tres estambres que alargan los filamentos durante su desarrollo, aproximando las anteras hacia el estigma (Fig. 3c). El estambre medio (ventral) alcanza mayor altura que los laterales enfrentándose con el estigma, mientras que los estambres laterales son más bajos y se ubican a los costados del mismo. Es frecuente encontrar flores con cuatro estambres. Las anteras jóvenes (estadio 1 a 3) muestran una consistencia muy tenue y son transparentes. Las anteras son indehiscentes, a pesar de poseer un endotecio bien desarrollado. Una vez producida la fecundación, el ovario se agranda y las anteras pierden turgencia, pero sin mostrar síntomas de dehiscencia. El gineceo está formado por un ovario unicarpelar, densamente veloso que aloja 2 óvulos en posición ventral (Fig. 3g). Los pelos del ovario se desarrollan tempranamente en la ontogenia de la flor. A partir del estadio 2 las células epidérmicas se alargan y ensanchan, tomando forma de clava y mostrando un núcleo grande, con nucleolo prominente y 1 o 2 vacuolas grandes en su citoplasma, resultando pelos unicelulares de dudosa función glandular, a pesar de su aspecto.

El estilo es sólido, corto y fuertemente curvado (Fig. 3g), lo que contribuye también al contacto de las anteras con el estigma. Tanto la zona de placentación como el estigma están orientados hacia el pétalo de mayor tamaño (ventral).

El estigma es apical y su superficie está cubierta por papilas con forma de “dedo de guante” (Fig. 3g).

Una vez producida la fecundación el cáliz se rompe debido a la presión que ejerce el ovario en crecimiento y la corola se hace visible. Al desarrollarse el fruto, la corola se pierde totalmente y quedan relictos del cáliz en la base del mismo.

Anteras y microsporangios

Ambos tipos de flores presentan anteras ditecas y bisporiangiadadas. Desde tempranas etapas del desarrollo se observa un saco polínico por teca y la llegada del haz vascular al tejido conectivo central de la antera (Figs. 2g y 3d). La epidermis es monoestratificada y recubre totalmente la antera en las primeras etapas del desarrollo de la misma. A medida que avanza el desarrollo, las células de la epidermis se aplastan y se separan entre sí, persistiendo en la antera madura como células dispersas en la superficie.

Las capas de la pared del microsporangio son evidentes en las flores muy jóvenes. En estadio 1 ambos tipos de flores presentan endotecio con células cuadrangulares, sin engrosamientos y tapete con citoplasma denso, que se tiñe intensamente (Figs. 2e y 3f). Las capas intermedias son evidentes en estadio 1 y constan de 2 capas celulares en las flores aéreas y una sola capa en las subterráneas. En el estadio 2 colapsan y el tapete permanece organizado, a veces con dos núcleos por célula en las flores subterráneas. El tapete es del tipo glandular o secretor al mantener la integridad de sus células durante el desarrollo de las micrósporas y permanece visible con células aisladas en el saco polínico, aún cuando los granos están maduros. En el estadio 2 de las flores aéreas el endotecio presenta engrosamientos en toda la superficie de los lóculos, mientras que en las subterráneas se hacen evidentes en el estadio 3. Si bien se produce su formación en las subterráneas, no se ha observado dehiscencia aún en las anteras maduras deshidratadas. Utilizando microscopio de fluorescencia y azul de metilo como fluorocromo, se observó que existe crecimiento de los tubos polínicos a través de la pared de la antera (Fig. 5a).

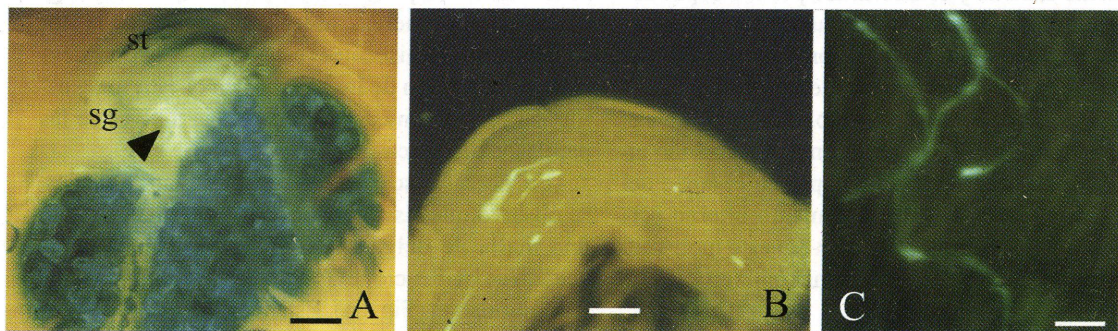


Fig. 5. Observación de tubos polínicos en flores subterráneas de *Trifolium polymorphum* por fluorescencia con azul de metilo. **A:** Granos de polen germinados y los tubos polínicos atravesando la pared de la antera (flecha) hacia el estigma (sg, estigma; st, estilo). **B:** Tubos polínicos recorriendo el estilo. **C:** Tubos polínicos llegando a la región de los óvulos. Las escalas representan 50 μm .

Microsporogénesis

En etapas tempranas del desarrollo de ambos tipos de flores (estadio 1), se observa tejido esporógeno, con células de contorno poligonal, sin espacios intercelulares, citoplasma denso, núcleos grandes y nucleolo prominente, siendo menor el número de células esporógenas en las flores subterráneas. Las células del tejido esporógeno se dividen tempranamente y forman tétradas tetraédricas de micrósporas (excepcionalmente decusadas en las flores subterráneas) mediante citocinesis simultánea en el estadio 2 (Figs. 2e y 3f).

En las flores aéreas algunas tétradas presentan micrósporas con aspecto diferente entre ellas en cuanto a tamaño y coloración (Fig. 2e), pareciendo en estado de degeneración. En el estadio 3 los granos de polen tienen esporoderma formado y presentan gran variación en coloración, tamaño y forma. En las flores subterráneas, si bien no se observaron anomalías en el estadio de tétrada, los granos de polen que se forman en el estadio 3 son esféricos en su mayoría y al igual que en las flores aéreas, algunos tienen contorno irregular y parecen en estado de degeneración (Fig. 3e).

Óvulo

El óvulo es campilótropo y bitégmico, con micrópila en zig-zag, en ambos tipos de flores (Fig. 2f). El tegumento externo tiene mayor desarrollo que el tegumento interno, sobrepasando al mismo desde etapas tempranas de la ontogenia. En el estadio 2 el tegumento externo de las flores aéreas posee 3-5 capas de células y ya ha cubierto más de la mitad de la nucela. El tegumento interno crece por debajo del tegumento externo y está formado por 2-3 capas celulares. En las flores subterráneas del mismo estadio, el tegumento externo está formado por 2-3 capas celulares, mientras que el interno presenta 2. A medida que se desarrolla el óvulo, el tegumento externo se engrosa considerablemente, alcanzando en el estadio 3, un grosor de 7-9 capas en el ápice del tegumento, mientras que el tegumento interno permanece con 2-3 capas de espesor. En este momento queda completamente definida la micrópila en zig-zag.

Megasporogénesis y megagametogénesis

En el óvulo joven (estadio 1), la nucela es prominente, los tegumentos están en crecimiento y se dife-

rencia la célula madre de megásporas por debajo de 3 o 4 capas de nucela (óvulo crasinucelado). Esta célula entra en meiosis y forma 4 megásporas, permaneciendo como funcional la megáspora calazal. Las divisiones de la megáspora funcional comienzan en el estadio 1 en las flores subterráneas y en el estadio 2 en las flores aéreas. Ocurren 3 divisiones mitóticas sucesivas para llegar a formar el saco embrionario 8-nucleado del tipo *Polygonum* en el estadio 4 de las flores aéreas y en el 3 de las subterráneas (Figs. 2d, 3h, 3i y 3j). La nucela es consumida a medida que se desarrolla el saco embrionario. Sin embargo las células nucelares del polo calazal de las flores aéreas se agrandan, alinean y alargan en el sentido longitudinal del saco embrionario, permaneciendo como un tejido laxo con células de citoplasma intensamente coloreado, siendo las últimas en desaparecer (Fig. 2d). A partir del estadio 3 en las flores subterráneas y del estadio 4 en las flores aéreas, el saco embrionario está completamente formado.

La zona más angosta de las sinérgidas se orienta hacia la micrópila. La oósfera es globosa, con núcleo grande y nucleolo prominente. Las antípodas son efímeras en ambos tipos de flores, desapareciendo inmediatamente luego de su formación en las flores aéreas y observándose alineadas en el polo calazal de las flores subterráneas antes de desintegrarse, aparentemente sin evidenciar formación de paredes celulares.

Se observó formación de cigoto desde el estadio 5 de las flores aéreas y del estadio 4 de las flores subterráneas.

Observación de tubos polínicos

La técnica de fluorescencia utilizada reveló la presencia de tubos polínicos creciendo sobre el estigma de las flores aéreas, antes de la antesis de la flor y con anteras dehiscentes (estadio 5). No se evidenció la penetración de los mismos en el estigma y estilo. El estigma mostró fluorescencia a nivel de las papilas estigmáticas.

En flores frescas que se encontraban húmedas, se observó que las anteras estaban aglomeradas por una malla de delgados hilos. Al aplicar α -naftil acetato se evidenció una red de tubos polínicos que las aglutinaban (Fig. 6a). Esta técnica, que revela los lugares donde existe actividad de esterases, muestra que el estigma tiene gran actividad de estas enzimas antes que abra la flor (Fig. 6b).

En las flores subterráneas, la técnica de fluores-

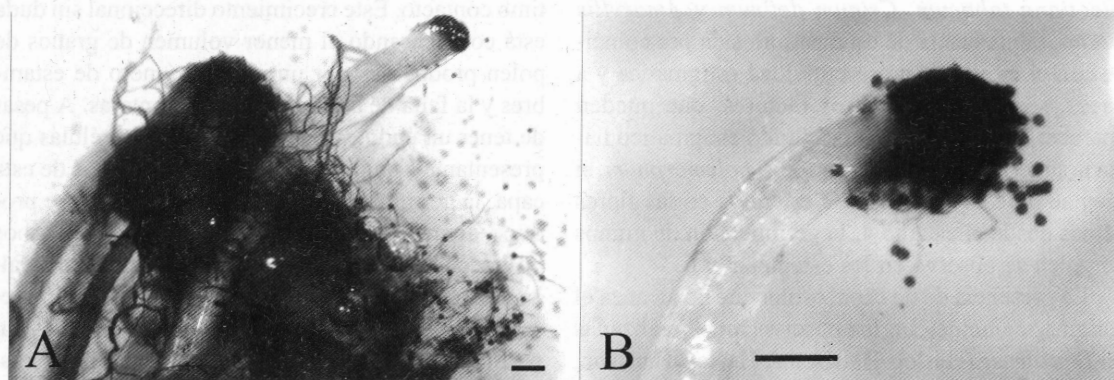


Fig. 6. Observación de tubos polínicos en flores aéreas de *Trifolium polymorphum* con α -naftil acetato. **A:** Granos de polen germinados en las anteras dehiscentes de flores en estadio 5 (corola cerrada). Nótese la red de tubos polínicos. **B:** Granos de polen germinados sobre el estigma de flor en estadio 6 (corola abierta). Las escalas indican 0,5 mm.

cencia reveló la presencia de tubos polínicos que atraviesan la pared de la antera y crecen hacia el estigma (Fig. 5a). También se constató el crecimiento de estos tubos a lo largo del estilo (Fig. 5b) y la llegada de los mismos al lóculo del ovario, a nivel de los óvulos (Fig. 5c).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Morfología floral

Las flores aéreas poseen corola papilionácea típica, mientras las flores subterráneas presentan alto grado de modificación en la morfología floral.

El nectario ubicado en las flores aéreas, entre el ovario y la columna estaminal, es poco prominente, reconociéndose macroscópicamente por la coloración verdosa y microscópicamente por la presencia de un tejido nectarífero típico, con células parenquimáticas pequeñas, citoplasma denso y núcleo grande (Fahn, 1988). Según la clasificación de Fahn (1953, 1979), basada en la topografía, el nectario de *T. polymorphum* sería estaminal en las primeras etapas de su desarrollo (estadio 1), ubicándose sobre la base de los filamentos como ocurre en otras especies del género *Trifolium*, en *Medicago* y *Retama* (Fahn, 1953). A partir del estadio 3 el nectario se localiza entre la base de los filamentos y el estigma, ubicándose en la categoría de nectario toral (b)(IV) como fue citado por Fahn (1975) para *Caesalpinia*, *Ceratonia*, *Cercis* y *Robinia*. En el caso de *T. polymorphum*, el nectario no recibe vascularización directa sino que está relacionado a la vascularización de los filamentos.

Esto también fue observado por Moore (1939 en Waddle & Lersten, 1973) en la tribu Phaseoleae.

El estigma apical y la superficie estigmática con papilas con forma de dedo de guante cubiertas por una cutícula fueron observados también en *T. pratense* y *T. repens* (Leduc *et al.*, 1990). En *T. pratense* la autoincompatibilidad es, sin duda, la barrera más efectiva contra la autogamia, pero la presencia de una cutícula impermeable sobre el estigma y la necesidad de "tripping", son determinantes importantes del sistema reproductivo de esta especie (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1983).

Según la clasificación de Heslop-Harrison & Shivanna (1977) la morfología de los estigmas del género *Trifolium* se ubica en el Grupo III: estigmas húmedos con papilas pequeñas a medianas. En los cortes histológicos realizados en este trabajo, no pudo observarse la presencia de una secreción copiosa a nivel de las papilas estigmáticas, pero en las observaciones con fluorescencia, el estigma presentó una marcada fluorescencia verde-amarillenta, del mismo modo que la observada en *T. repens* y *T. pratense* (Leduc *et al.*, 1990). Si bien serían necesarios análisis específicos de reconocimiento de sustancias, estas observaciones sugieren la presencia de contenidos lipídicos, a nivel de la superficie de las papilas estigmáticas, que posiblemente jueguen un rol importante en la adhesión de los granos de polen al estigma.

Al realizar la reacción colorimétrica con α -naftil acetato, el estigma de las flores aéreas se coloreó desde tempranas etapas del desarrollo de la flor, indicando actividad de esterasas sobre el mismo. Sin embargo, como fue analizado por Shivanna & Sastri (1981) en estigmas húmedos de *Petunia hybrida*,

Nicotiana tabacum, *Crinum defixum* y *Amaryllis vittata*, la presencia de esterazas no siempre coincide con el momento de receptividad estigmática y a veces, son necesarios otros factores, que pueden aparecer con la secreción del fluido estigmático hacia la superficie. En el estigma de *T. polymorphum*, si bien se detectó actividad de esterazas en las flores aéreas desde el estadio 4, la germinación de granos de polen se observó en los estadios 5 y 6.

La presencia de un canal estilar que no alcanza el estigma, coincide con las observaciones realizadas en *T. pratense* (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1982; Leduc *et al.*, 1990). El aspecto de dicho canal estilar, sin paredes celulares claramente definidas y con restos celulares en su interior, hace pensar en un origen lisígeno, al igual que fue observado en *T. pratense* por Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1982). La técnica utilizada puede causar distorsiones físicas y químicas durante el corte de estas estructuras de origen lisígeno, ocasionando interpretaciones erróneas (Owens & Stirton, 1989).

Las flores subterráneas están muy modificadas, tanto en su morfología como en su funcionalidad. El cáliz engrosado en forma de capuchón es una adaptación evidente de protección a la penetración en un ambiente subterráneo. Este capuchón cubre completamente a la flor hasta que dentro de ella se ha producido la fecundación. La corola se asemeja al tipo papilionáceo como la corola de las flores aéreas, pero con una reducción en el número de piezas y pérdida evidente de la coloración. El pétalo externo grande, de posición ventral, se asemeja al estandarte de las corolas papilionáceas, mientras que los dos pétalos internos, simétricos, son asociables a las alas en este tipo de corolas. En la modificación y reducción de la corola han desaparecido los pétalos que formaban la quilla. La quilla es una pieza muy importante para las flores aéreas del tipo papilionáceo, ya que encierra a los verticilos fértiles de la flor, ofreciéndoles protección. Además cumple un rol importante en la orientación de los visitantes florales y su actividad dentro de la flor, siendo utilizada como plataforma de aterrizaje por los polinizadores. Estas funciones dejan de tener sentido en una flor subterránea donde la actividad de los polinizadores no es necesaria y la protección de la flor es lograda por piezas más resistentes como el cáliz.

El número de estambres se redujo en relación al número presente en las flores aéreas. Analizando el desarrollo de la flor se observó que las anteras y el estigma se desarrollan de tal forma que logran un ín-

timo contacto. Este crecimiento direccional sin duda está compensando el menor volumen de granos de polen producidos por un menor número de estambres y la falta de dehiscencia de las anteras. A pesar de tener un endotecio desarrollado, con células que presentan los engrosamientos característicos de esta capa, la germinación de los granos de polen se produce dentro del lóculo de la antera y los tubos polínicos atraviesan la pared de la misma, hasta alcanzar el estigma. El endotecio a través de un proceso de deshidratación crea una tensión sobre la superficie de la antera y provoca la apertura de la misma por la zona de mayor debilidad: el estomio. Es posible que en las flores subterráneas de *T. polymorphum*, no se alcance la deshidratación de las anteras y el endotecio, por lo tanto, pierda su funcionalidad. Estas flores subterráneas crecen en un ambiente más homogéneo que las flores aéreas y posiblemente sea relativamente fácil mantener condiciones de humedad más constantes. La apariencia de las anteras de las flores subterráneas revela un mayor contenido de agua (Fig. 3c), que es mantenido hasta el estadio floral en que se produce la fecundación. El contenido de humedad de dichas anteras probablemente también favorezca la germinación de los granos de polen dentro del lóculo de la antera.

Procesos embriológicos

El análisis de los procesos embriológicos que ocurren en ambos tipos de flores permite concluir que existe un alto grado de modificación en los verticilos florales de las flores subterráneas con respecto a las flores aéreas, pero la estructura anatómica y los procesos embriológicos que en ellas ocurren son muy similares. Las modificaciones de las flores subterráneas ocurren principalmente a nivel de los verticilos estériles (reducción del número y modificación en la consistencia de las piezas, pérdida de la pigmentación) y del androceo (reducción del número de piezas, modificaciones en la funcionalidad de las mismas), pero la estructura anatómica de las piezas florales es muy similar a las de las aéreas. Las anteras de ambos tipos de flores son bisporangiadas, como fuera citado para 6 especies de este género por Kazimierski & Kazimierska (1977), no incluyéndose *T. polymorphum*. Estos autores observaron especies con 4 ó 2 microsporangios, e incluso especies con número variable de microsporangios (2,3,4). La variabilidad en el número de sacos polínicos no es fre-

cuenta según dichos autores, encontrándose en géneros tales como *Persea*, *Cucumis* y *Trifolium*.

Las anteras están cubiertas por una capa de epidermis que no acompaña su desarrollo y persiste en la madurez, como una capa colapsada, con células separadas entre sí. La pared del saco polínico es similar en ambos tipos de flores, aunque existe una reducción, de 2 a 1 capa de células, en las capas intermedias de las flores subterráneas. El tapete es de tipo secretor y puede presentar células binucleadas, característica no frecuente en Papilionoideas (Prakash, 1987). El endotecio, si bien está presente en ambas flores, en las subterráneas ha perdido su funcionalidad. Esta característica ya había sido descrita por Ascherson, 1884 en Uphof (1938), como una de las modificaciones de las flores subterráneas cleistógamas. Este autor le dio el nombre de polinización cleistoantérica en contraposición a la polinización casmoantérica, en que se liberan los granos de polen por dehiscencia de las anteras.

El tejido microsporogénico muestra menor número de células en las flores subterráneas, en parte como consecuencia de la reducción en el tamaño de las anteras.

En ambos tipos de flores se forman tétradas tetraédricas de micrósporas por citocinesis simultánea. Las micrósporas y los granos de polen presentan en ellas las mismas irregularidades en cuanto al proceso meiótico y la morfología final. Hindmarsh (1964) observó ciertas anomalías en las tétradas de micrósporas de *T. pratense*, como la presencia de una o dos micrósporas supernumerarias que, originadas posiblemente por cromosomas que quedan retrasados en la segregación en anafase, forman finalmente micronúcleos. También observó tétradas que presentaban dos micrósporas de aspecto normal, la tercera muy grande y la cuarta muy pequeña. Estas dos últimas permanecían en estado uninucleado hasta la dehiscencia de la antera. Es probable que en *T. polymorphum* los granos de polen con diferente morfología y coloración que se observan en las anteras maduras, sean producto de aberraciones meióticas en la formación de las micrósporas. Estas anomalías en la meiosis pueden considerarse uno de los factores intrínsecos causantes del bajo potencial reproductivo de las flores aéreas.

El ovario de las flores aéreas aloja 2 a 4 (5) óvulos, de los cuales se desarrollan 1 ó 2 como semillas, mientras que el ovario de las flores subterráneas, si bien aloja sólo 2, ambos se desarrollan como semillas.

Los óvulos son campilótrofos, bitégmicos y con micrópila en zig-zag, pero si bien el tegumento interno presenta el mismo número de capas celulares (2-3) en ambos tipos de flores, el tegumento externo presenta de 7-9 capas en las subterráneas y 3-5 capas en las aéreas.

El desarrollo del gametófito femenino es igual en ambos tipos de flores y el saco embrionario es del tipo *Polygonum*. Esta característica está presente en la mayoría de los géneros que integran esta familia, aunque sacos bispóricos han sido citados en *Wisteria sinensis* y *Pueraria lobata* (Rembert, 1967, 1969 en Cameron & Prakash, 1994).

Las antípodas son efímeras en los sacos embrionarios de ambos tipos de flores, lo que confirma observaciones anteriores en otras especies del género (Hindmarsh, 1964; Krupko, 1973; Prakash, 1987).

La persistencia de células nucelares en el polo calazal de las flores aéreas concuerda con las observaciones realizadas en los géneros *Adesmia* y *Stylosanthes* por Izaguirre *et al.* (1994, 1998). Al igual que en las especies estudiadas por estas autoras, es probable que estas células se relacionen con la calaza para la nutrición del gametófito femenino.

Las observaciones efectuadas en este trabajo permiten concluir que las flores subterráneas son autógamas. Se constató que la fecundación ocurre estando la flor encerrada por el cáliz y los tubos polínicos crecen atravesando la pared de la antera hacia el estigma, descienden por el estilo y alcanzan los óvulos de la propia flor.

Las flores aéreas presentan características comunes a aquellas polinizadas por insectos, aunque observaciones sistemáticas realizadas en esta misma población no detectaron visitantes efectivos para la polinización (Speroni, 2000). Si bien se observaron tubos polínicos creciendo sobre el estigma de la propia flor, no se observó el desarrollo de los mismos a lo largo del estilo. Se constató en este trabajo la formación de cigoto en el estadio 5, cuando aún no ocurrió la antesis. Esta observación junto a la producción de semillas en cabezuelas embolsadas y aisladas de polen foráneo, realizada por Speroni (2000), indica que en la población estudiada hay producción de semillas en forma autógamma.

Sin duda la anficarpia resulta una estrategia reproductiva muy ventajosa para la persistencia de esta especie *pratense*-que necesita del beneficio de la herbivoría para no ser eliminada por la competencia de los pastos altos-dado que sus inflorescencias aéreas son muy apetecidas por el ganado. Mientras

la parte aérea de esta especie es consumida por los herbívoros, la producción de frutos subterráneos asegura el mantenimiento de la especie en el lugar y a lo largo de toda la extensión de los estolones y las semillas de los frutos aéreos podrían eventualmente, colonizar nuevos espacios.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Desarrollo en Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República, en el marco del cual se realizó el trabajo de Tesis del que forma parte esta publicación, como requisito para obtener el título de Magíster en Biología, Opción Botánica.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el apoyo económico otorgado para la ejecución de dicha Tesis. A los integrantes del Laboratorio de Botánica, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía.

BIBLIOGRAFÍA

- BURKART, A. 1952. *Las Leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. Ed. ACME, Buenos Aires.
- BURKART, A. 1987. *Flora Ilustrada de Entre Ríos*. III. Colección Científica del INTA. 6, Buenos Aires.
- CAMERON, B. G. & N. PRAKASH. 1994. Variation of the megagametophyte in the Papilionoideae. In: FERGUSON, I. K. & S. C. TUCKER (eds.), *Advances in Legume Systematics. Structural Botany*, pp. 97-115. Royal Bot. Gard., Kew.
- COLL, J. & A. ZARZA. 1992. Leguminosas nativas promisorias: Trébol polimorfo y babosita. *Bol. Divulg. Inst. Nac. Invest. Agropec.* 22: 1-19.
- DAFNI, A. 1992. *Pollination Ecology. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford University Press, New York.
- FAHN, A. 1953. The topography of the nectary in the flower and its phylogenetical trend. *Phytomorphology* 3: 424-426.
- FAHN, A. 1975. *Plant Anatomy*. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- FAHN, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London.
- FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *Tansley Review* N° 14. *New Phytol.* 108: 229-257.
- FEVEREIRO-BARBOSA, V. P. 1987. *Macroptilium* (Benth) Urban do Brasil (Leguminosae-Faboideae-Phaseoleae-Phaseolinae). *Arq. Jard. Bot. Rio de Janeiro* 23: 109-180.
- FRANKEL, R. & E. GALUM. 1977. *Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding*. Springer-Verlag, Berlin.
- HESLOP-HARRISON, J. & Y. HESLOP-HARRISON. 1982. Pollen-stigma Interaction in the Leguminosae: the secretory system of the style in *Trifolium pratense* L. *Ann. Bot.* 50: 635-645.
- HESLOP-HARRISON, J. & Y. HESLOP-HARRISON. 1983. Pollen-stigma interactions in the Leguminosae: the organization of the stigma in *Trifolium pratense* L. *Ann. Bot.* 51: 571-583.
- HESLOP-HARRISON, J. & K. R. SHIVANNA. 1977. The receptive surface of the Angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41: 1233-1258.
- HINDMARSH, C. J. 1964. Gametophyte development in *Trifolium pratense* L. *Austr. J. Bot.* 12: 1-14.
- IZAGUIRRE, P. 1995. Especies indígenas y subespontáneas del género *Trifolium* L. (Leguminosae) en el Uruguay. *Serie Técnica* 58: 1-22. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.
- IZAGUIRRE, P., S. MEROLA & R. BEYHAUT. 1994. Seed ontogeny in *Adesmia securigerifolia* (Fabaceae-Adesmieae). *Nordic J. Bot.* 14: 547-556.
- IZAGUIRRE, P., S. MEROLA & R. BEYHAUT. 1998. Vías de acceso de nutrientes al embrión en desarrollo en dos especies de *Stylosanthes* Sw. (Fabaceae-Aeschynomeneae). *Agrociencia* 2: 89-102.
- KAZIMIERSKI, T. & E. M. KAZIMIERSKA. 1977. Structure of anther heads in some *Trifolium* L. species. *Acta Soc. Bot. Pol.* 43: 321-330.
- KRUPKO, S. 1973. Megasporogenesis and development of the embryo sac in the Palestine variety of *Trifolium alexandrinum* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* 42: 617-625.
- LEDUC, N., G. C. DOUGLAS, M. MONNIER & V. CONNOLLY. 1990. Pollination in vitro: effects on the growth of pollen tubes, seed set and gametophytic self-incompatibility in *Trifolium pratense* L. and *T. repens* L. *Theor. Appl. Genet.* 80: 657-664.
- OWENS, S. J. & C. H. STIRTON. 1989. Pollen, stigma, and style interactions in the Leguminosae. In: C. H. STIRTON & J. L. ZARUCCHI (eds.), *Advances in Legume Biology*, pp. 105-112. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 29. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- PRAKASH, N. 1987. Embryology of the Leguminosae. In: POLHILL, R. & P. RAVEN (eds.), *Advances in Legume Systematics* 2, pp. 241-278. Royal Bot. Gard., Kew.
- RIVALS, P. 1953. Sur quelques Légumineuses géocarpes et amphicarpes. *Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop.* 33: 244-249.
- ROSENGURTT, B. 1943. *Estudios sobre praderas naturales del Uruguay. 3ª Contribución. La estructura y el pastoreo de las praderas en la región de Palleros. Flora de Palleros*. Barreiro y Ramos S.A, Montevideo.
- ROSENGURTT, B. 1946. *Estudios sobre praderas naturales del Uruguay. 5ª Contribución. Normas usuales de manejo de praderas naturales en J. Jackson. Flora de J. Jackson*, Imprenta Rosgal, Montevideo.

G. Speroni & P. Izaguirre de Artucio, Morfología y Esporogénesis en *Trifolium polymorphum*

- SHIVANNA, K. R. & D. C. SASTRI. 1981. Stigma-surface esterase activity and stigma receptivity in some taxa characterized by wet stigmas. *Ann. Bot.* 47: 53-64.
- SHIVANNA, K. R. & N. S. RANGASWAMY. 1992. *Pollen Biology. A Laboratory Manual*. Springer-Verlag, Berlin.
- SPERONI, G. 2000. *Aspectos de la Biología Reproductiva de Trifolium polymorphum Poir. (Fabaceae, Papilionoideae)*. Tesis de Maestría, Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas, Universidad de la República, Uruguay.
- UPHOF, J. C. Th. 1938. Cleistogamic flowers. *Bot. Rev.* 4: 21-49.
- WADDLE, R. M. & N. R. LERSTEN. 1973. Morphology of discoid floral nectaries in Leguminosae, especially tribe Phaseoleae (Papilionoideae). *Phytomorphology* 23: 152-161.

Recibido el 04 de Mayo de 2001, aceptado el 12 de Julio de 2001.