

# ESTUDIOS EMBRIOLOGICOS EN *CABOMBA AUSTRALIS* (*NYMPHAEACEAE*) II-ONTOGENIA DE LA SEMILLA

Por B. G. GALATI<sup>1</sup>

## SUMMARY

Endospermogenesis, perispermogenesis and ontogeny of seed integuments are studied in *Cabomba australis* Speg. (*Nymphaeaceae*).

The endosperm is helobial. The micropilar chamber first is nuclear and afterward becomes cellular and the chalazal one is differentiated an 1-nucleate haustorium. The mature seed is perispermate and the reserve material is starch.

Both ovular integuments are present in the mature seed. Their cells are modified in shape, size and wall specialization. The external epiderm of the first integument is highly papillose and the internal epiderm of the second integument is tanniferous.

## INTRODUCCION

En este trabajo se analizan la ontogenia del tegumento seminal, la endospermogénesis y la perispermogénesis, a fin de completar el estudio realizado con anterioridad (Galati, 1985), sobre la esporogénesis y las generaciones sexuadas en *Cabomba australis* Speg.

Los trabajos pioneros de Cook (1902, 1906 y 1909) sobre la endospermogénesis en la familia *Nymphaeaceae*, comprenden el estudio de unas pocas especies: *Nymphaea advena*, *Castalia ampla*, *Castalia odorata*, *Brasenia purpurea*, *Cabomba piauhiensis* y *Nelumbo lutea*. Otros estudios sobre la formación del endosperma fueron realizados por Conard (1905) en su monografía para el género *Nymphaea*; Valceva y Savich (1965) en otras dos especies de *Nymphaea*: *N. candida* y *N. tetragona*; Davis (1966) enumera los tipos de endosperma presentes en las familias *Cabombaceae* y *Nymphaeaceae*.

Melikian (1964) realizó la anatomía comparada de la cubierta seminal de los géneros: *Euryale* y *Victoria*; Schneider (1978) estudió a *Barclaya longifolia* y Schneider & Ford (1978) hicieron lo mismo con *Ondinea purpurea*. Corner (1976) describe los caracte-

---

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pabellón II. Ciudad Universitaria. Núñez. 1428 Buenos Aires. Argentina.

res generales de la semilla para la familia. Collinson (1980) realiza un estudio comparativo de las cubiertas seminales de Nymphaeaceas fósiles y actuales. Las referencias de este autor sobre las cuatro especies de *Cabomba*: *C. aquatica*, *C. piauhiensis*, *C. australis* y *C. caroliniana*, se refieren únicamente a la morfología externa de la semilla madura, sin hacer consideraciones de carácter ontogenético. Por otra parte, este autor ilustra con microfotografía una sola de dichas especies: *C. aquatica*.

En general puede decirse que poco se conoce sobre el género *Cabomba* y nada desde el punto de vista ontogenético. Debido a esto se decidió encarar este estudio, con el fin de aportar nuevos datos que ayuden a esclarecer la discutida posición taxonómica de este género en la familia (Hui-Lin Li, 1955).

#### MATERIAL Y METODO

El material de *C. australis* fue coleccionado en la provincia de Buenos Aires, Paraná de las Palmas y Canal 6, el 6/I/81 por la autora (BAA 17031). Las plantas se fijaron en FAA. Las semillas en distintos grados de desarrollo se incluyeron en parafina y se hicieron cortes seriados con micrótopo tipo Minot. Las coloraciones usadas fueron: metacromática con violeta de cresilo (Dizeo de Strittmatter, 1980) y doble de safranina-"fast green" (Dizeo de Strittmatter, 1979), y el medio de montaje: bálsamo de Canadá sintético. Los reactivos usados para la determinación de mucílagos fueron: rojo de rutenio y azul de cresilo; para las sustancias grasas: Sudán IV, para proteínas: eosina y para taninos: sulfato férrico y formaldehído (Jensen, 1962).

Los dibujos fueron realizados con el tubo de dibujo Wild por la autora. Se hicieron además observaciones con Microscopio Electrónico de Barrido de las papilas del tegumento seminal.

#### OBSERVACIONES

##### *Endospermo y perispermo-génesis*

El saco embrionario maduro de *C. australis* tiene una disposición celular que corresponde al tipo "Oenothera".

Luego de la fertilización, el núcleo endospermogénico sufre una división mitótica. Uno de los núcleos hijos migra hacia el extremo calazal y el otro hacia el micropilar. Inmediatamente se produce la citocinesis y quedan formadas así dos cámaras: una micropilar y otra calazal (Fig. 1, A). Esta última se mantiene uninucleada

y forma un haustorio. Su núcleo incrementa el volumen, lo que implica un aumento del material cromático (Fig. 1, C). En estadios más avanzados cuando el embrión es globular, presenta signos de degeneración, esto es, pérdida de cariolinfa y disminución de los nucléolos, adquiriendo carácter picnótico.

La cámara micropilar permanece uninucleada durante los primeros estadios del proembrión (Fig. 1, B, D), pero cuando aparecen en éste las primeras paredes longitudinales, ya han ocurrido numerosas divisiones nucleares libre en el endosperma que dan como resultado un cenocito (Fig. 1, E). La citocinesis en la cámara micropilar se produce cuando el embrión llega al estado globular (Fig. 1, F).

El tejido reservante endospermico, muy escaso, se forma exclusivamente a partir de la cámara micropilar. Sus células acumulan lípidos y proteínas. Estas últimas posiblemente cumplan un rol muy importante durante las primeras etapas del desarrollo del embrión. No obstante, la mayor parte del material de reserva tiene su origen en las células nucelares que forman el perisperma (Fig. 2, A). Hasta el momento de la descarga del tubo polínico, las células nucelares presentan un citoplasma bastante denso, con varios vacúolos pequeños. Las células más próximas al saco embrionario se ven menos vacuolizadas. Luego de ocurrida la fertilización, y simultáneamente a la formación de las dos cámaras, micropilar y calazal, las células de la nucela aumentan su tamaño, como así también el volumen de sus núcleos, incrementando probablemente su contenido de cromatina. Este último carácter posiblemente favorezca la alta producción de almidón, el cual se acumula en forma de granos simples, que terminan por ocupar casi todo el volumen celular (Fig. 1, G). Asimismo, se diferencia una capa de células periféricas, que corresponde a la epidermis nucelar, con granos de almidón de un tamaño muy inferior con respecto a los que se encuentran en el resto del tejido (Fig. 2, G-H).

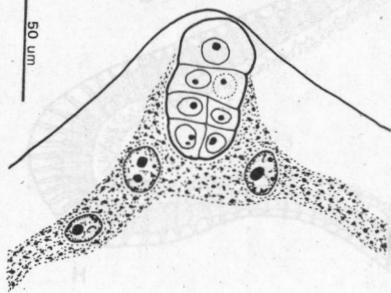
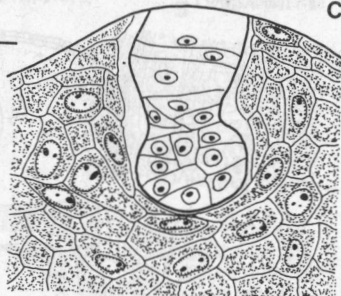
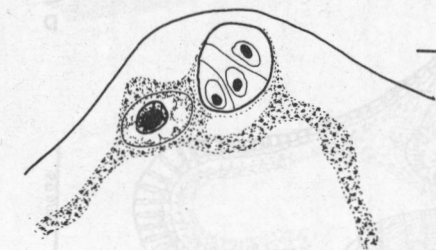
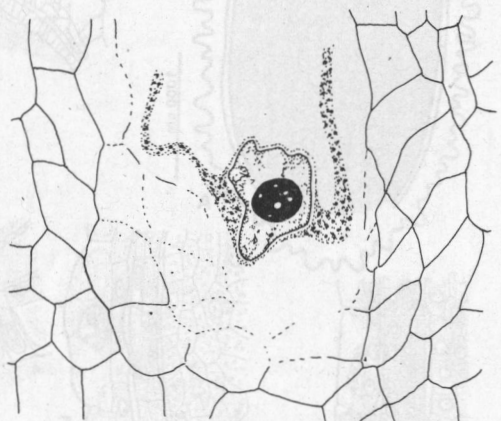
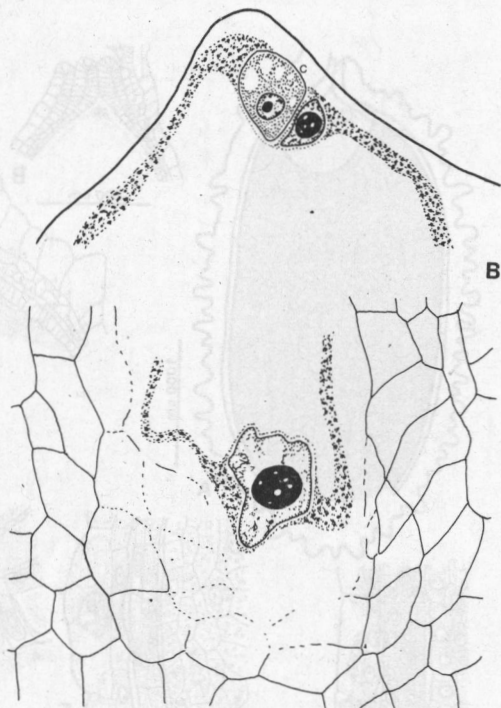
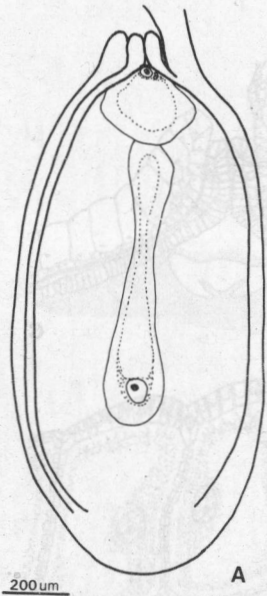
### *Tegumento seminal*

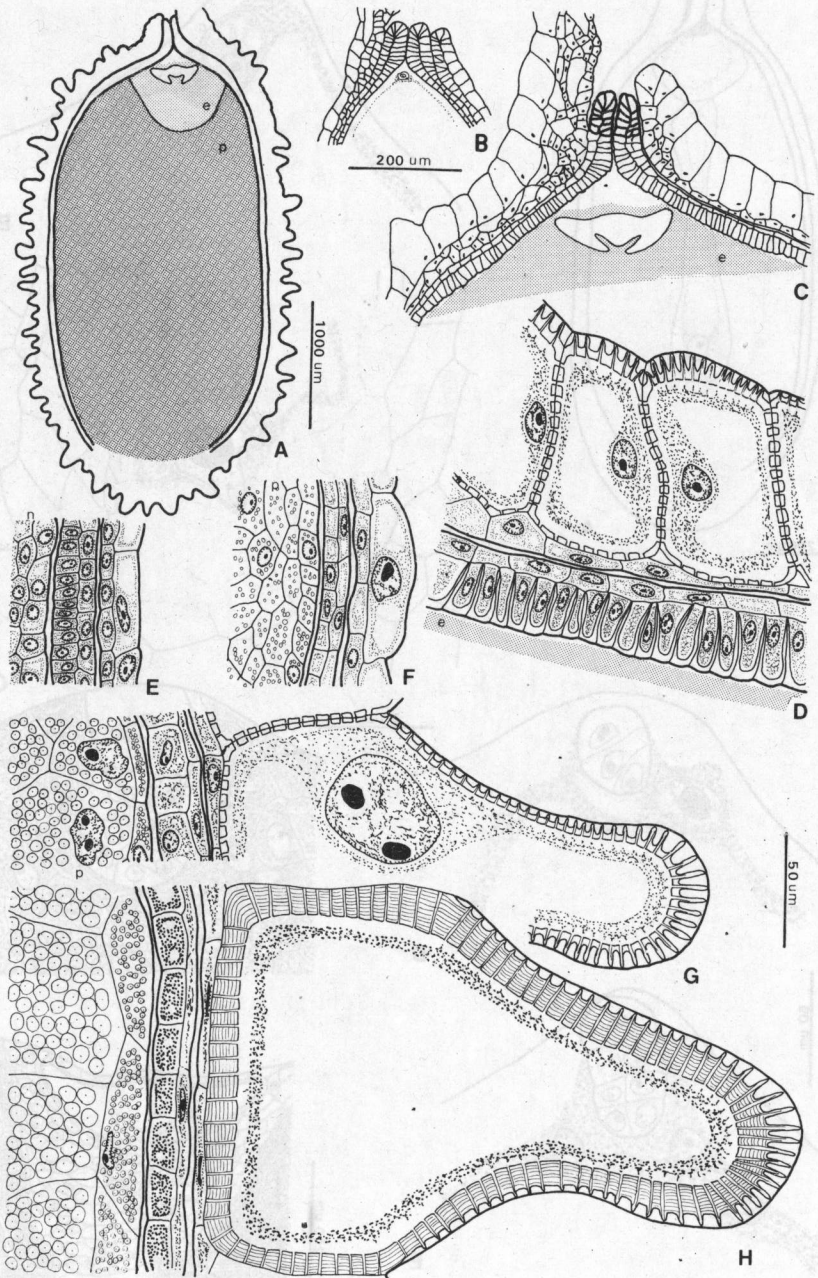
Los dos tegumentos presentes en el óvulo, cada uno con dos capas de células de espesor, persisten en la semilla madura. Sus células, en general, experimentan un aumento de volumen para acompañar el crecimiento total de la semilla.

Las células de la capa externa de la cubierta seminal son las que presentan mayores transformaciones en cuanto a tamaño, forma y especialización de sus paredes. Debemos distinguir aquí las células del área que rodea el micrópilo de las que se ubican en el resto de la superficie de la semilla. Las primeras poseen la cara tangencial externa levemente convexa (Fig. 2, D; 3, B), mientras

que las segundas se diferencian como papilas muy protuberantes (Fig. 2, A, H; Fig. 3, A, C, D). Ambas desarrollan paredes secundarias especializadas. La cara tangencial externa de estas células presenta, por debajo de la pared primaria, una capa de material mucilaginoso, y por debajo de ésta, varios estratos lignificados. Las paredes radiales y tangencial interna carecen del estrato mucilaginoso y sólo presentan los espesamientos lignificados. Estas paredes están atravesadas por numerosas puntuaciones simples distribuidas regularmente en todas las superficies. Las paredes de los canales de estas puntuaciones en la cara tangencial externa, también están lignificados en la zona que corresponde al estrato mucilaginoso, de manera que se visualizan como pequeños conos cuando son analizados con el Microscopio Electrónico de Barrido. Estos conos son más altos y más gruesos en el extremo de la papila (Fig. 2, G-H; Fig. 3, E-F). El proceso de diferenciación de estas células sigue los siguientes pasos. En un comienzo difieren poco de las restantes células tegumentarias. Durante el período inicial de crecimiento de la semilla se expanden lateralmente sin modificar su altura (Fig. 2, E-F). Al mismo tiempo, su núcleo aumenta considerablemente su volumen, lo mismo que el o los nucléolos. Simultáneamente su citoplasma se enriquece acumulando almidón. A partir de este momento se forman grandes vacúolos que son responsables de la forma papilosa de la célula. Durante este período comienzan a diferenciarse el material mucilaginoso y más tarde los estratos secundarios que posteriormente se lignifican. Al mismo tiempo disminuyen sus reservas de almidón (Fig. 2, G). Cuando las papilas se diferencian totalmente aparece en su interior abundante material tánico (Fig. 2, H). El estrato celular interno del tegumento externo en el área que rodea al perisperma no sufre mayores especializaciones. En la zona del micrópilo, las dos capas que componen el tegumento externo, luego de producida la fertilización, crecen y sobrepasan al tegumento interno. La capa más interna del tegumento externo experimenta algunas divisiones en

Fig. 1.— *Endospermogénesis*. A: óvulo después de la fecundación, endosperma dividido en dos cámaras: micropilar y calazal haustorial; B: detalle del extremo micropilar, cigota (c) y núcleo del endosperma; C: extremo del haustorio calazal uninucleado, lisis de las células nucleares circundantes; D: proembrión tricelular, cámara micropilar del endosperma aún uninucleada; E: proembrión más avanzado rodeado por endosperma nuclear; F: proembrión globular rodeado del tejido endospermico; G: embrión maduro rodeado del tejido endospermico y más afuera el perisperma amiláceo. Escalas 200  $\mu\text{m}$ : A; 50  $\mu\text{m}$ : B-G.





varios sentidos dando origen a un tejido en el cual se forman algunos espacios intercelulares (Fig. 2, B-C).

El tegumento interno del óvulo sufre variaciones considerables respecto de su estado original. Estos cambios afectan principalmente al estrato interno de este tegumento. El externo no se modifica mayormente y en la semilla madura, en el área que rodea al perisperma, se aplanan y tiende a obliterarse (Fig. 2, H). El estrato de células internas desarrolla una morfología especial en la zona que se halla en contacto con el endosperma. Aquí sus células son altas, con paredes tangenciales externas primarias delgadas y tangenciales internas y radiales gruesas e impregnadas de cutina; citoplasma denso con pocos vacúolos, y los núcleos tendiendo en su mayoría a ocupar una posición periférica. Estas características corresponden a lo que puede considerarse un endotelio (Fig. 2, D). En cuanto a las células restantes, que se hallan en contacto con el perisperma, son algo aplanadas con abundante material tánico en su interior, sin que sea posible distinguir sus núcleos (Fig. 2, H).

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

La morfología de la epidermis externa del tegumento seminal de *C. australis* concuerda en parte con lo visto en los géneros *Euryale* y *Victoria* (Melikian, 1964), ya que en todos estos casos son células papilosas, de paredes gruesas y lignificadas, y atravesadas por canales de puntuaciones. Las observaciones de Collinson (1980) en cuanto al número de capas en el tegumento de la semilla madura y a la naturaleza papilosa de las células de la epidermis del mismo, son coincidentes con lo observado en este trabajo.

Según Corner (1976), las semillas de *Cabomba* al igual que las de *Brasenia*, son operculadas, pero en la especie estudiada no se observó la presencia de un opérculo funcional (Font Quer, 1953).

Cook (1906) establece dos tipos de endosperma para la familia *Nymphaeaceae*: 1) Endosperma celular desde el inicio, presente en *Nymphaea*, *Castalia* y *Nelumbo*; 2) Endosperma primero nuclear, luego celular, presente en *Brasenia* y *Cabomba*. Davis (1966), agre-

Fig. 2.— *Ontogenia del tegumento seminal*. A: semilla madura, esquema; B: micrópilo de un óvulo recién fecundado; C: micrópilo de una semilla madura; D: tegumentos seminales en la zona de contacto con el endosperma; E-H: distintos estadios del desarrollo de los tegumentos seminales en la zona de contacto con el perisperma. Símbolos: e: endosperma; p: perisperma; n: nucela. Escalas 1000  $\mu\text{m}$ : A; 200  $\mu\text{m}$ : B; 50  $\mu\text{m}$ : C-H.

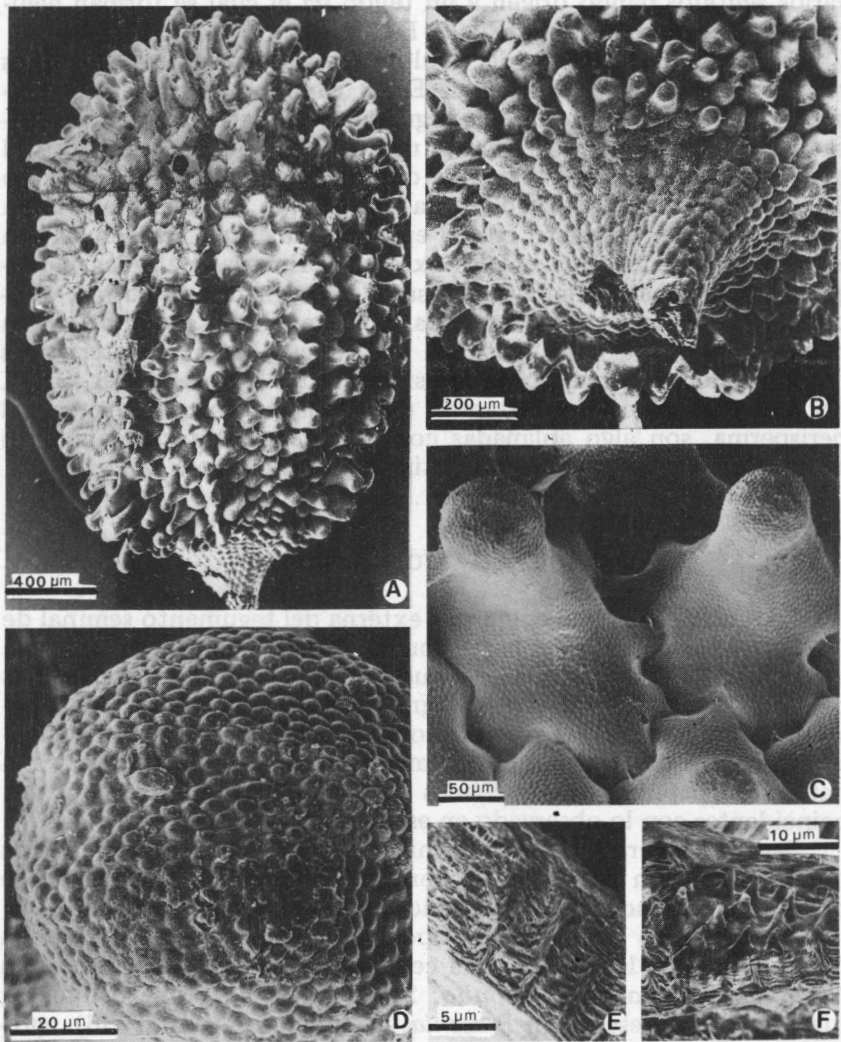


Fig. 3.— *Semilla observada con Microscopio Electrónico de Barrido*. A: aspecto externo; B: detalle de la zona micropilar; C: detalle de las papilas; D: detalle del extremo de una papila; E: corte de la pared de una papila, estratificación de la pared y canales de las puntuaciones; F: pared de una papila en corte. Estratos lignificados y prolongaciones de los canales de las puntuaciones que se visualizan como pequeños conos, debido a que se ha desprendido la capa externa o pared primaria que los recubre.

ga a los tipos citados por Cook (*op. cit.*) el género *Euryale* con endosperma nuclear. Conard (1905), en su monografía para el género *Nymphaea* no describe en detalle el desarrollo del endosperma, pero sus ilustraciones para la especie *N. lotus* muestran un endosperma en la cámara micropilar al inicio nuclear y luego celular.

Las observaciones realizadas en este trabajo concuerdan con lo establecido por estos autores. Esto es, el desarrollo del endosperma en *C. australis* corresponde al tipo helobial. La cámara micropilar es en un comienzo nuclear, y luego se produce la tabicación y se transforma en celular. De acuerdo al sistema EODP establecido por Di Fulvio (1983), el endosperma de *Cabomba* deriva del tipo heteropolar micropilar de la endospermogénesis celular.

De las observaciones realizadas hasta el momento para los distintos representantes de la familia, se desprende la necesidad de profundizar más el estudio de algunos de los géneros, por lo que sería prematuro realizar conclusiones de tipo taxonómico.

#### AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a los Profesores Dr. A. E. Cocucci y Dra. E. Ancibor por su valiosa dirección, como así también al eficiente servicio técnico de Microscopía Electrónica de Barrido del CONICET.

#### BIBLIOGRAFIA

- BATYGINA, T. B. & SHAMIROV, I. I. 1985. Comparative embryology of *Nymphaeales* and *Nelumbonales* orders and the problems in their systematics and phylogeny. *Bot. Zhurn. (Moscow & Leningrad)* 70: 368-373 (en ruso).
- COOK, M. T., 1902. Development of the sacs and embryos of *Castalia odorata* and *Nymphaea advena*. *Bull. Torrey Bot. Club* 29: 211-220.
- 1906. The embryogeny of some Cuban *Nymphaeaceae*. *Bot. Gaz.* 42: 376-392.
- 1909. Notes on the embryology of the *Nymphaeaceae*. *Bot. Gaz.* 48: 56-60.
- COLLINSON, M. E. 1980. Recent and tertiary seeds of the *Nymphaeaceae sensu lato* with revision of *Brasenia ovula* (Brong) Reid and Chandler. *Ann. Bot.* 46 (5): 603-632.
- CONARD, H. S. 1905. The Waterlilies: a monograph of the genus *Nymphaea*. *Publ. Carnegie Inst. Wash.* 4. Chapter III: 95-105.
- CORNER, E. H. 1976. *The seeds of dicotyledons*. 2 Vol. Cambridge University Press. Cambridge.
- DAVIS, G. L. 1966. *Systematic Embriology of Angiosperms*. John Wiley & Sons. N.Y. London. Sidney.

- DI FULVIO, T. E. 1983. Los "tipos" de endosperma y de haustorios endospermicos. Su clasificación. *Kurtziana* 16: 7-32.
- DIZEO DE STRITTMATTER, C. G. 1979. Modificación de una coloración safranina fast-green. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 18 (3-4): 121-122.
- 1980. Coloración con "violeta de Cresyl". *Bol. Soc. Argent. Bot.* 19 (1-2): 273-276.
- FONT QUER, P. 1953. *Diccionario de Botánica*. 1244 págs. Editorial Labor, S.A. Barcelona, Madrid, Buenos Aires, Río de Janeiro, México, Montevideo.
- GALATI, B. G. 1985. Estudios embriológicos en *Cabomba australis* (Nymphaeaceae). I. La esporogénesis y las generaciones sexuales. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 24 (1-2): 29-47.
- JENSEN, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry*. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- LI, HUI LIN. 1955. Classification and phylogeny of Nymphaeaceae and allied families. *Amer. Midl. Naturalist.* 54: 33-41.
- MELIKIAN, A. P. 1964. Comparative anatomy of seedcoat in some representatives of Nymphaeaceae. *Bot. Žurn. (Moscow & Leningrad)*. 49: 432-36.
- SCHNEIDER, E. L. 1978. Morphological studies of the Nymphaeaceae. IX. The seed of *Barclaya longifolia* Wall. *Bot. Gaz.* 139: 223-30.
- SCHNEIDER, E. L. and E. G. FORD. 1978. Morphological studies of the Nymphaeaceae. X. The seed of *Ondinea purpurea* Den Hatog. *Bull. Torrey Bot. Club.* 105: 192-200.
- VALCEVA, O. et E. I. SAVICH. 1965. Le développement embryonnaire de *Nymphaea candida* et *N. tetragona*. *Bot. Žurn. (Moscow & Leningrad)*. 50: 1323-1326. (en ruso).

## BIBLIOGRAFÍA

- BATYGINA, T. B. & SHAMIROV, I. I. 1983. Comparative embryology of Nymphaeales and Nelumbonales orders and the problems in their systematic and phylogeny. *Bot. Zhurn. (Moscow & Leningrad)* 70: 585-573 (en ruso).
- COOK, M. T. 1902. Development of the sac and embryo of *Cabomba* and *Nymphaea*. *Bull. Torrey Bot. Club* 29: 217-220.
- 1908. The embryology of some Green Nymphaeaceae. *Bot. Gaz.* 42: 278-282.
- 1909. Notes on the embryology of the Nymphaeaceae. *Bot. Gaz.* 45: 36-60.
- COLLISON, M. E. 1980. Recent and tertiary seeds of the Nymphaeales: a new genus and a new species of *Nymphaea* (Nymphaeaceae). *Ann. Bot.* 46 (2): 603-632.
- CONARD, R. S. 1905. The Waterlilies: a monograph of the genus *Nymphaea*. *Publ. Cambridge Inst. Wash. & Chapter III: 56-105*.
- CORNER, E. H. 1914. The seeds of dicotyledons. 2 Vols. Cambridge University Press, Cambridge.
- DAVIS, G. J. 1966. Systematic Embryology of Angiosperms. John Wiley & Sons, N.Y. London, Sidney.