

ESTUDIOS EMBRIOLOGICOS EN LA TRIBU SPERMACOCEAE (RUBIACEAE) PARTE I: ANATOMIA FLORAL. MEGASPOROGENESIS. MEGAGAMETOGENESIS.¹

Por BEATRIZ G. GALATI²

Summary Embriological studies on the tribe Spermacoceae (Rubiaceae). Part I: Floral anatomy. Megasporogenesis. Megagametogenesis. This is the first part of an embriological study of some representatives of the tribe Spermacoceae (Rubiaceae) in Argentine. The floral anatomy, the megasporogenesis and the megagametogenesis have been studied in seventeen species. These show a new ovule type compared with six types mentioned by Fagerlind (1937). The megagametophyte types of Fagerlind (1937) were also observed in the studied material. Six species exhibit the *Richardsonia* type, ten species the *Vaillantia* type, and one (*Borreria sulcata*) shows an intermediate type with the chalazal antipodal cell shorter than those of the *Vaillantia* type. The discussion and general phylogenetical conclusions will be recorded in the third and last part of this study.

INTRODUCCION

La familia *Rubiaceae* es una de las más numerosas del reino vegetal. Se calcula que comprende unas 6500 especies (Cronquist, 1981) distribuidas en 29 tribus (Verdcourt, 1958). Su distribución geográfica comprende casi todo el mundo, aunque la mayor diversidad de géneros se halla en las regiones tropicales y subtropicales de América, África y Asia. Las relaciones filogenéticas entre sus géneros no son todavía bien conocidas. Las evidencias fósiles en forma de polen o frutos sólo se conocen para un género (*Galium*) de modo que este tipo de información hasta ahora no ha contribuído a esclarecer el problema filogenético. Sin embargo, la información de carácter embriológico se ha mostrado como un campo promisorio en cuanto a proporcionar datos que permitan relacionar distintos géneros.

Los trabajos pioneros de Lloyd (1902) y Fagerlind (1937) que por otra parte son los más detallados y completos que existen hasta el momento, comprenden el estudio de alrededor de 30 especies, lo cual representa menos del 1% del total de integrantes de la familia.

Con posterioridad, se han realizado, algunos otros estudios referentes a la gametogénesis y la fertilización en la familia (Fagerlind, 1936; Farooq, 1959; Lloyd, 1904, 1905; Raman, 1954; Shivaramiah *et al.*, 1961, 1964; Siddiqui *et al.*, 1968). En lo que respecta a los estudios sobre la morfología y vascularización de la flor (Fukuoka, 1978, 1979; Weberling, 1977) podemos decir que son muy escasos.

De lo citado precedentemente se deduce la importancia de continuar con el análisis del resto de los representantes a fin de tener un panorama general que permita extraer conclusiones en favor de un ordenamiento más natural de la familia.

Con esta idea se decidió llevar a cabo un estudio embriológico de algunos representantes de la tribu *Spermacoceae* de la cual muy poco se sabe a este respecto, y que, por otra parte, se encuentra bien representada en nuestro país.

Siete son los géneros que componen esta tribu en la Argentina:

Borreria: Es un género de regiones tropicales y subtropicales, representado en África, Asia y Australia, pero sobre todo rico en especies americanas. Comprende dos secciones:

Secc. Borreria: caracterizada por poseer inflorescencias en cimas capituliformes. Con aproximadamente 14 especies de las cuales se tomaron como representativas para este estudio 6.

Secc. Galianthe: caracterizada por poseer inflorescencia en cimas laxas. Consta de 10 especies en la Argentina, de las cuales fueron estudiadas dos.

¹ Primera parte de la Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas.

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pabellón II. Ciudad Universitaria. Núñez. 1428 Buenos Aires, Argentina.

Diodia: Es un género con mayoría de especies de América templado cálida. En nuestro país se hallan presentes alrededor de 4 especies, de las cuales 3 fueron estudiadas en este trabajo.

Mitracarpus: En su mayoría de América templado-cálida, también en África e isla del Pacífico. De las especies que lo componen, alrededor de 15, se reconocen 3 ó 4 como argentinas. En este trabajo se realizó el estudio de 2 de ellas.

Richardia: Habita regiones templado-cálidas de América, desde México y SE de EE.UU. hasta centro de Argentina. De las 15 especies que lo integran, 4 son argentinas. Se tomaron las dos más representativas para este trabajo.

Spermacoce: Género de reducido número de especies si se aceptan sus límites en sentido estricto. En América hay alrededor de 6 especies de las cuales sólo una se encuentra en nuestro territorio.

Staelia. Género exclusivamente americano. Habita en las regiones templado-cálidas de América del Sur. Se citan alrededor de 10 especies de las cuales dos serían argentinas.

El presente trabajo, que constituye la primera parte del estudio embriológico realizado en la tribu, comprende el análisis anatómico de las estructuras florales relacionadas con el proceso de fertilización, la vascularización de la flor, y la organización y desarrollo de los megagametófitos.

MATERIALES Y METODOS

Los materiales coleccionados fueron fijados en FAA (Formol-Alcohol y Acido acético). Las flores en distintos estados de desarrollo fueron incluidas en Paramat. Posteriormente se hicieron cortes seriados con micrótopmo tipo Minot entre 8 y 10 um.

Las coloraciones usadas fueron: metacromática con violeta de cresilo (Dizeo de Strittmatter, 1980) y doble de safranina-fast green (Dizeo de Strittmatter, 1979). Como medios de montaje se utilizaron: Bálsamo de Canadá sintético y Depex.

Para la detección de azúcares en el nectario se utilizó el licor de Fehling.

Fue de ayuda para el reconocimiento del almidón el uso de un microscopio con Luz Polarizada.

Los dibujos fueron realizados por la autora, con la ayuda de un tubo de dibujo.

Las descripciones realizadas en el capítulo de observaciones son comunes a todas las especies estudiadas, si hay alguna particularidad se lo indica especialmente.

A continuación se cita el material argentino estudiado y su procedencia:

Borreria brachystemonoides Cham. et Schlecht.
Prov. Corrientes: Dpto. Capital, Riachuelo, Lomada arenosa, 22/XII/1983, Cabral 472 (SI).

Borreria eryngioides Cham. et Schlecht.
Prov. Salta: Dpto. Orán, ruta 50, entre Orán y Río Pescado, 19/III/1986, Guaglianone 1973 (SI).

Borreria nelidae Cabral.
Prov. Misiones: Dpto. Concepción de la Sierra, Ruta 1, 5 Km de Concepción de la Sierra, 18/XII/83, Cabral et al. 463 (SI).

Borreria spinosa (L.) Cham. et Schlecht.
Prov. Chaco: Dpto. Independencia, 2 Km a Cnia. J. Mármol, 3/VIII/1971, Boelcke 9597 (BAA).

Borreria sulcata (N. Bacigal.) Cabral
Prov. Entre Ríos: Dpto. Uruguay, Concepción del Uruguay, Balneario Banco Pelay, 17/II/85, Bacigalupo y Degnani 116 (SI); Dpto. Concordia, Ayuí, 25/III/1984, Troncoso, Bacigalupo y Arroyo 3799 (SI).

Borreria verticillata (L.) Meyer.
Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia, Ayuí, Represa Salto Grande, 25/III/1984, Troncoso 3787 (SI).

Borreria (Galianthe) fastigiata (Griseb.) K. Schum.
Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia, Ayuí, 25/III/1984, Troncoso 3797 (SI).

Borreria (Galianthe) laxa Cham. et Schlecht.
Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia, Norte de Concordia, Barrio la Bianca, 24/III/1984, Troncoso 3808 (SI).

Diodia brasiliensis Sprengel.
Prov. Buenos Aires: Ptdo. San Isidro, San Isidro, III/1984, Galati 20300 (BAA); Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia, Nueva Escocia, arroyo Yerma, 27/III/1984, Troncoso 3836 (SI).

Diodia dasycephala Cham. et Schlecht.
Prov. Buenos Aires: Tandil, Cerro la Movediza, I/1984, Galati 20302 (BAA).

Diodia schumannii Standl. ex N. Bacigal.
Prov. Misiones: Dpto. Iguazú, Catarata, 4/I/68, Krapovickas y Cristóbal 13696 (SI). Prov. Entre Ríos: isla Curuzú-Chali, 10/IV/1968, Burkart et al. 27103 (BAA).

Mitracarpus hirtus (L.) DC.
Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia. Barrio La Bianca. 25/III/84. Troncoso 3809 (SI).

Mitracarpus megapotamicus (Spreng.) OK.
Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia, Ayuí. 25/III/1984. Troncoso 3785 (SI).

Richardia brasiliensis Gomes.
Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia. Ayuí, 25/III/1984, Troncoso 3784 (SI). Prov. Misiones: Dpto. Iguazú, Cataratas, Parque Nacional Iguazú, 12/XII/1983, Hunziker, Naranjo y Ulibarri 10992 (SI); Dpto. Iguazú; Cataratas, Parque Na-

cional Iguazú, 12/XII/1983, Hunziker, Naranjo y Ulibarri 10992 (SI); Dpto. Iguazú, Cataratas, 6/IV/1985, Galati 20298 (BAA).

Spermace tenuior L.

Prov. Jujuy: Dpto. Capital, Ruta 9 entre Lozano y arroyo Yutumayo, 22/III/1986, Guaglianone et al. 2035 (SI). Dpto. Ledesma, Calilegua, 20/III/1986, Guaglianone et al. 1990 (SI).

Spermaceodes glabrum (Michx.) O.K. var *rectum* N. Bacigal.

Prov. Entre Ríos: Dpto. Uruguay, balneario Banco Pelay, 17/II/1985. Bacigalupo y Deginani, 115 (SI). Dpto. Concordia, Ayuí, 25/III/1984, Troncoso 3798 (SI).

Staelia thymoides Cham. et Schlecht.

Prov. Entre Ríos: Dpto. Federación, Chajarí, 29/III/1984, Troncoso 3857 (SI).

ABREVIATURAS USADAS:

CT: corte transversal.
CL: corte longitudinal.
hv: haz vascular.

OBSERVACIONES

Flor, organización y vascularización

Las flores son perfectas, epíginas y actinomorfas. El cáliz es gamosépalo 4-5 dentado. La corola es blanca, gamopétala, tubulosa o algo infundibuliforme, de tubo corto o largo, y limbo 4-lobado (2-4 en *D. dasycephala*). Los estambres son cuatro, soldados al tubo de la corola. En *Diodia dasycephala* se han observado flores con 4, 3 ó 2 estambres. Las anteras son de dehiscencia longitudinal. El ovario es ínfero, bicarpelar, bilocular y el estilo se continúa en dos ramas estigmáticas filiformes o tendiendo a capitada. Hay un óvulo anátropo por lóculo. Sólo *Richardia brasiliensis* presenta un cáliz 6-dentado, corola 6-lobada, a veces con tinte rosado, 6 estambres y ovario tricarpelar y estilo trifido.

El estilo corresponde al tipo sólido (Fig. 1, A, B), con un tejido transmisor de células de contenido denso, con paredes gruesas (Fig. 1, C), a través de las cuales avanza el tubo polínico. El tejido transmisor se conecta con un cómpito que posee tantas ramas como carpelos. Este cómpito es de tipo abierto aunque el lúmen del canal es prácticamente virtual (Fig. 2, E). La epidermis de esta estructura es de tipo secretor.

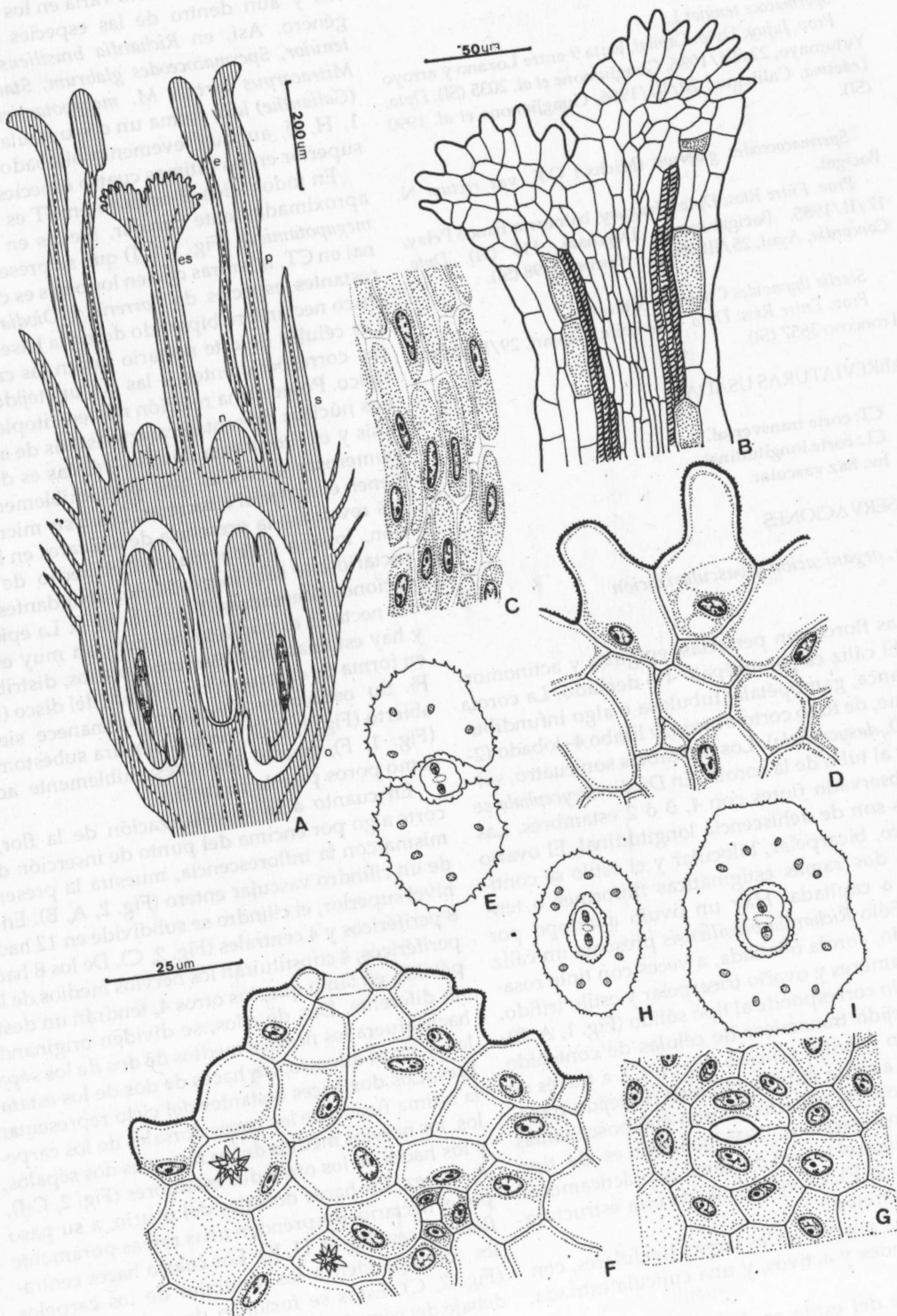
El estigma posee papilas largas 1-celulares, con núcleos grandes y activos, y una cutícula estriada (Fig. 1, D).

En la base del estilo se desarrolla un nectario (Fig. 1, A) en forma de un disco anular grueso. La

morfología del nectario varía en los distintos géneros y aún dentro de las especies de un mismo género. Así, en *Richardia brasiliensis*, *Spermace tenuior*, *Spermaceodes glabrum*, *Staelia thymoides*, *Mitracarpus hirtus*, *M. megapotamicus* y *Borreria (Galianthe) laxa* forma un disco anular entero (Fig. 1, H, I), aunque levemente bilobado en su parte superior en las últimas cuatro especies.

En todos ellos el nectario en CT es de contorno aproximadamente circular, menos en *Mitracarpus megapotamicus* (Fig. 1, I, J) que se presenta octogonal en CT, mientras que en los otros es circular. Las restantes especies de *Borreria* y *Diodia* poseen el disco nectarífero bipartido desde la base (Fig. 1, E). Las células de este nectario tienen las características correspondientes a las de un tejido secretor típico. Poseen una relación núcleo-citoplasma alta. Los núcleos presentan características de activa síntesis y el citoplasma de estas células es denso con numerosas vesículas que, presumiblemente, contienen el material a secretar. Los tests microquímicos revelaron la presencia de azúcares en la secreción, lo que concuerda con el hecho de que el nectario esté sólo invadido por abundantes terminaciones floemáticas (Fig. 1, E, H, I). La epidermis del nectario es papilosa con cutícula muy estriada y hay estomas, relativamente escasos, distribuidos en forma de corona sobre el borde del disco (Fig. 1, F). Su ostiolo es grande y permanece siempre abierto (Fig. 1, F-G), no hay cámara subestomática (Fig. 1, F), por lo que presumiblemente actúan como poros para la secreción.

En cuanto a la vascularización de la flor, un corte algo por encima del punto de inserción de la misma con la inflorescencia, muestra la presencia de un cilindro vascular entero (Fig. 2, A, B). En un nivel superior, el cilindro se subdivide en 12 haces, 8 periféricos y 4 centrales (Fig. 2, C). De los 8 haces periféricos, 4 constituirán los nervios medios de los pétalos, en tanto que, los otros 4, tendrán un destino diferente. Dos de ellos, se dividen originando hacia afuera los nervios medios de dos de los sépalos, y hacia adentro, los haces de dos de los estambres. Los dos haces restantes del ciclo representan la íntima fusión de los haces dorsales de los carpelos, los nervios medios de los restantes dos sépalos, y los haces de los otros dos estambres (Fig. 2, C-J). A su vez, los haces dorsales del ovario, a su paso por el nectario, desprenden unas ramas puramente floemáticas (Fig. 2, H, K). Los cuatro haces centrales corresponden a los ventrales de los carpelos (Fig. 2, C). Estos se fusionan de a dos, algo por debajo del cómpito, donde la fusión de los carpelos es incompleta (Fig. 2, D). Luego, aún más arriba, cada uno de ellos penetra en el estroffolo de un óvulo y termina allí, sin llegar al estilo (Fig. 2, E).



Este tipo de vascularización se observa en todas las especies de ovario bicarpelar estudiadas. En el caso de *Richardia brasiliensis*, cuyo ovario es 3-carpelar, el patrón de vascularización es básicamente el mismo. Solamente difiere en que parte de un anillo de 12 haces periféricos y 3 centrales. En la Fig. 2, L puede verse un CT de esta flor en un nivel superior.

Ovulo y megasporogénesis

El óvulo es anátropo y posee un único tegumento de varias capas de espesor. Se caracteriza por tener una estructura particular denominada estroffolo (Fig. 3, B, C). El óvulo comienza desde el inicio de su formación siendo anátropo. La formación del estroffolo es muy rápida. En los primeros estadios ya comienza a visualizarse como una expansión a la altura del rafe a modo de un disco más o menos elíptico (Fig. 3, A-C).

El tejido arqueosporico puede estar representado por una (Fig. 3, A) o más arqueosporas, pero usualmente sólo una origina el saco embrionario. La nucela está formada prácticamente por la epidermis nucelar representada por unas pocas células que se ubican en el polo micropilar de la o las arqueosporas, y que con el desarrollo de la megáspora funcional, aparecen reducidas, concluyendo por desaparecer poco antes de la primera cariocinesis.

Debido a que existe una sólo capa de células nucleares por encima de la arqueospora, el óvulo corresponde al tipo tenuinucelado. Esta epidermis nucelar está representada sólo por tres células de forma piramidal (Fig. 3, B; Fig. 4, A). En primordios de óvulos muy jóvenes, las células de la epidermis nucelar son aproximadamente isodiamétricas (Fig. 3, A). Al crecer y cerrarse el micrópilo, estas células son comprimidas en su cara externa y adquieren la forma piramidal típica.

La célula madre de las megásporas sufre división meiótica y como consecuencia de ésta se forma una tétrade de megásporas de disposición lineal. La megáspora calazal es más grande y es la que se va a desarrollar en el saco embrionario (Fig. 3, D-E; Fig. 4, B-C). En *Borreria brachystemonoides*, *B. nelidae*, *B. verticillata*, *B. spinosa* y *Staelia thymoides* varias arqueosporas sufren meiosis y

como consecuencia se forman varias tétrades de megásporas por óvulo. En las restantes especies suele haber en los óvulos jóvenes más de una arqueospora, pero sólo una de ellas sufre reducción meiótica.

Megagametófito

El saco embrionario por su ontogenia corresponde al tipo *Polygonum*. Es 8-nucleado y 7-celular (Fig. 3, I, J; Fig. 4, I; Fig. 5, A).

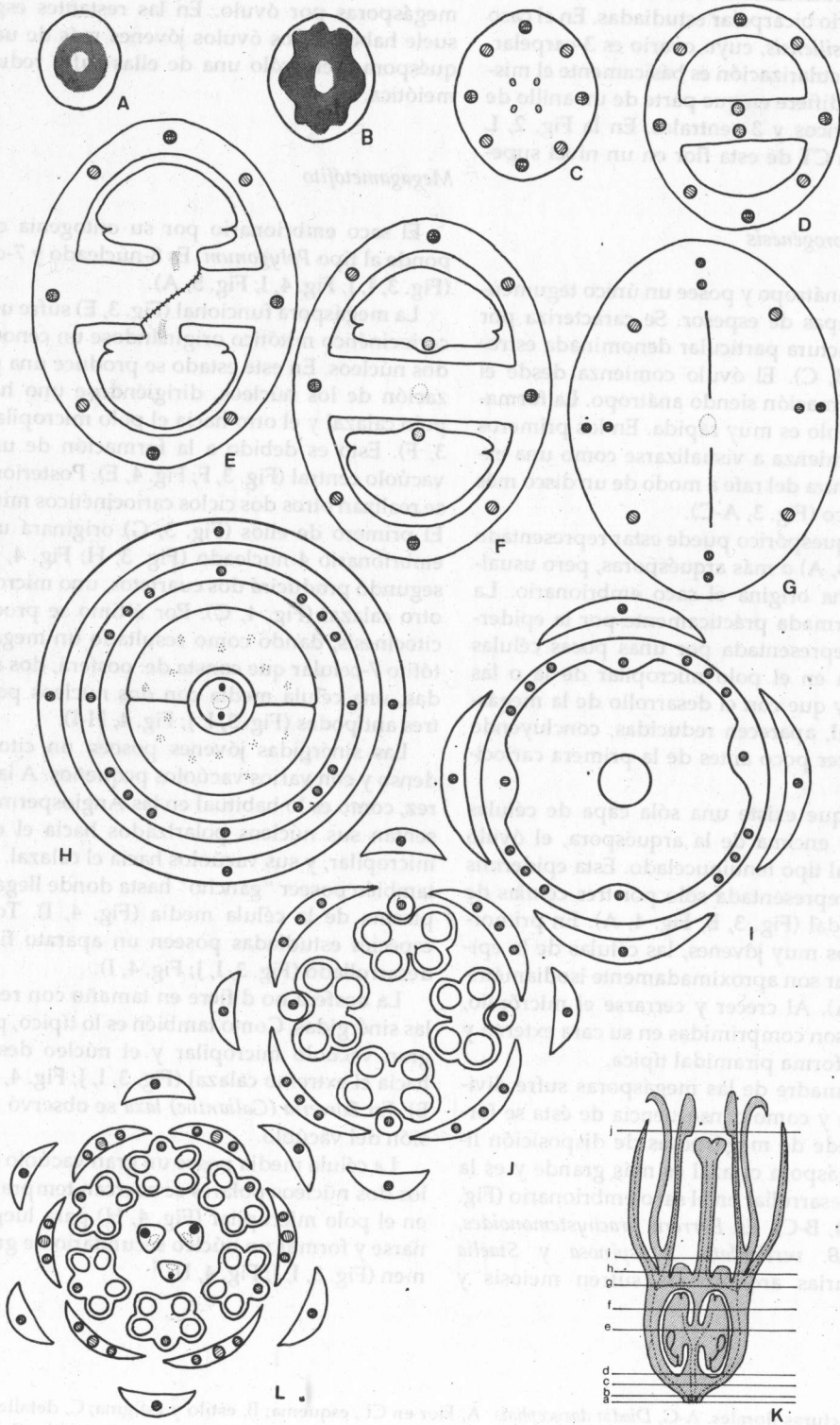
La megáspora funcional (Fig. 3, E) sufre un ciclo cariocinético mitótico originándose un cenocito de dos núcleos. En este estado se produce una polarización de los núcleos, dirigiéndose uno hacia el polo calazal y el otro hacia el polo micropilar (Fig. 3, F). Esto es debido a la formación de un gran vacúolo central (Fig. 3, F; Fig. 4, E). Posteriormente se realizan otros dos ciclos cariocinéticos mitóticos. El primero de ellos (Fig. 3, G) originará un saco embrionario 4-nucleado (Fig. 3, H; Fig. 4, F) y el segundo producirá dos cuartetos, uno micropilar y otro calazal (Fig. 4, G). Por último se produce la citocinesis, dando como resultado un megagametófito 7-celular que consta de: oosfera, dos sinérgidas, una célula media con dos núcleos polares y tres antípodas (Fig. 3, I, J; Fig. 4, H-I).

Las sinérgidas jóvenes poseen un citoplasma denso y con varios vacúolos pequeños. A la madurez, como es lo habitual en las Angiospermas, presentan sus núcleos polarizados hacia el extremo micropilar, y sus vacúolos hacia el calazal. Pueden también poseer "gancho" hasta donde llega el citoplasma de la célula media (Fig. 4, I). Todas las especies estudiadas poseen un aparato filar bien desarrollado (Fig. 3, I, J; Fig. 4, I).

La oosfera no difiere en tamaño con respecto a las sinérgidas. Como también es lo típico, posee un gran vacúolo micropilar y el núcleo desplazado hacia el extremo calazal (Fig. 3, I, J; Fig. 4, I; Fig. 6, B). En *Borreria (Galianthe) laxa* se observó la inversión del vacúolo.

La célula media posee un gran vacúolo central y los dos núcleos polares se acercan tempranamente en el polo micropilar (Fig. 4, H) para luego fusionarse y formar un núcleo secundario de gran volumen (Fig. 3, I, J; Fig. 4, I).

Fig. 1.— Estructuras florales. A-G, *Diodia dasycephala*: A, Flor en CL, esquema; B, estilo y estigma; C, detalle del tejido transmisor del estilo; D, detalle de papilas estigmáticas; E-G, nectario; E-F, en CT; E, esquema; F, detalle; G, epidermis, vista superficial; H-I, nectario en CT, esquemas; h, *Mitracarpus hirtus*; I, *Mitracarpus megapoticus*. s. sépalo, p. pétalo, e. estambre, es. estilo y estigma, n. nectario, o. ovario. Reglas. A, E, H e I 200 μ m, B, 50 μ m, C, F y G 25 μ m.



Las antípodas son las que presentan características más peculiares, y de acuerdo a esto podemos reconocer dos grupos: 1) Con antípoda haustorial, 2) Sin antípoda haustorial. En el primer tipo, dos de las antípodas son comparativamente pequeñas, mientras que la otra es mucho mayor en tamaño (de 2 a 10 veces superior en volumen) y con función haustorial. Las más pequeñas poseen citoplasma denso con un vacuoma reducido (Fig. 4, H-I). Ocasionalmente alguna de ellas puede sufrir una división posterior luego de producida la fecundación. La forma y posición de estas dos antípodas varía en las distintas especies y aún a veces entre los individuos de una misma especie. Pueden ser de contorno cuadrangular (Fig. 3, J; Fig. 4, H) a triangular (Fig. 4, I) y disponerse en forma paralela (Fig. 3, J; Fig. 4, H-I) o verticalmente, una arriba de la otra. La antípoda que ocupa la posición calazal es muy larga y su núcleo aumenta de volumen posiblemente por un proceso de endomitosis. Debido a la actividad de esta célula se produce entonces la digestión de los tejidos ovulares en la zona calazal formándose una suerte de espacio angosto que es ocupado por el megagametófito. Este tipo de aparato antipodal aparece en: *Diodia dasycephala*, *D. schumannii*, *Staelia thymoies*, *Borreria nelidae*, *B. brachystemonoides*, *B. spinosa*, *B. verticillata*, *B. sulcata*, *B. eryngioides*, *Mitracarpus hirtus* y *M. megapotamicus* (Fig. 4, H-I; Fig. 5, D).

En cuanto al segundo tipo de antípodas, podemos decir que las tres células son relativamente pequeñas, de igual tamaño y función, con núcleos de volumen comparable. Su forma es subpiramidal y están dispuestas generalmente a la misma altura (Fig. 3, I; Fig. 5, E). Este tipo de aparato antipodal se encuentra en: *Borreria (Galianthe) laxa*, *B. (Galianthe) fastigiata*, *Spermaceodes glabrum*, *Spermaceo tenuior*, *Diodia brasiliensis* y *Richardia brasiliensis*.

Se ha observado la presencia de grandes cantidades de almidón en el saco embrionario desde el estado temprano binucleado, en todas las especies estudiadas (Fig. 3, E-J; Fig. 4, E-I).

En las especies en las que hay formación de más de una tétrade de megásporas, a la madurez aparecen varios sacos embrionarios por óvulo en distintos estados de desarrollo. Se ha observado también más de un saco embrionario totalmente maduro, pero sólo uno de ellos llega a ser fecundado. En *Borreria brachystemonoides* y *Staelia thymoies* se genera una competencia aún mayor debido a la formación de una cantidad superior de sacos embrionarios por óvulo, en comparación con las restantes especies que presentan esta característica. Debido a esto, algunos sacos embrionarios penetran en el micrópilo con la consecuente destrucción de los tejidos de éste. El micrópilo queda entonces más corto, resultando esto en un menor recorrido de los tubos polínicos para llegar al aparato oosférico. A su vez, las sinérgidas de estas dos especies presentan en estos megagametófitos, una morfología distinta. Son largas y aguzadas en el extremo micropilar, sin gancho, debido a que deben acomodarse al estrecho ámbito del micrópilo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

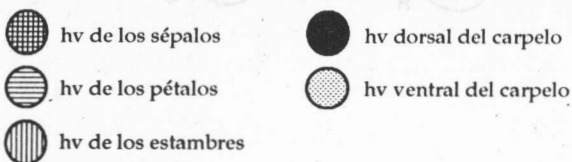
El estigma de todas las especies estudiadas pertenece al grupo II (Superficie húmeda papilosa, con papilas 1-celulares) de la clasificación de Heslop-Harrison y Shivanna (1977).

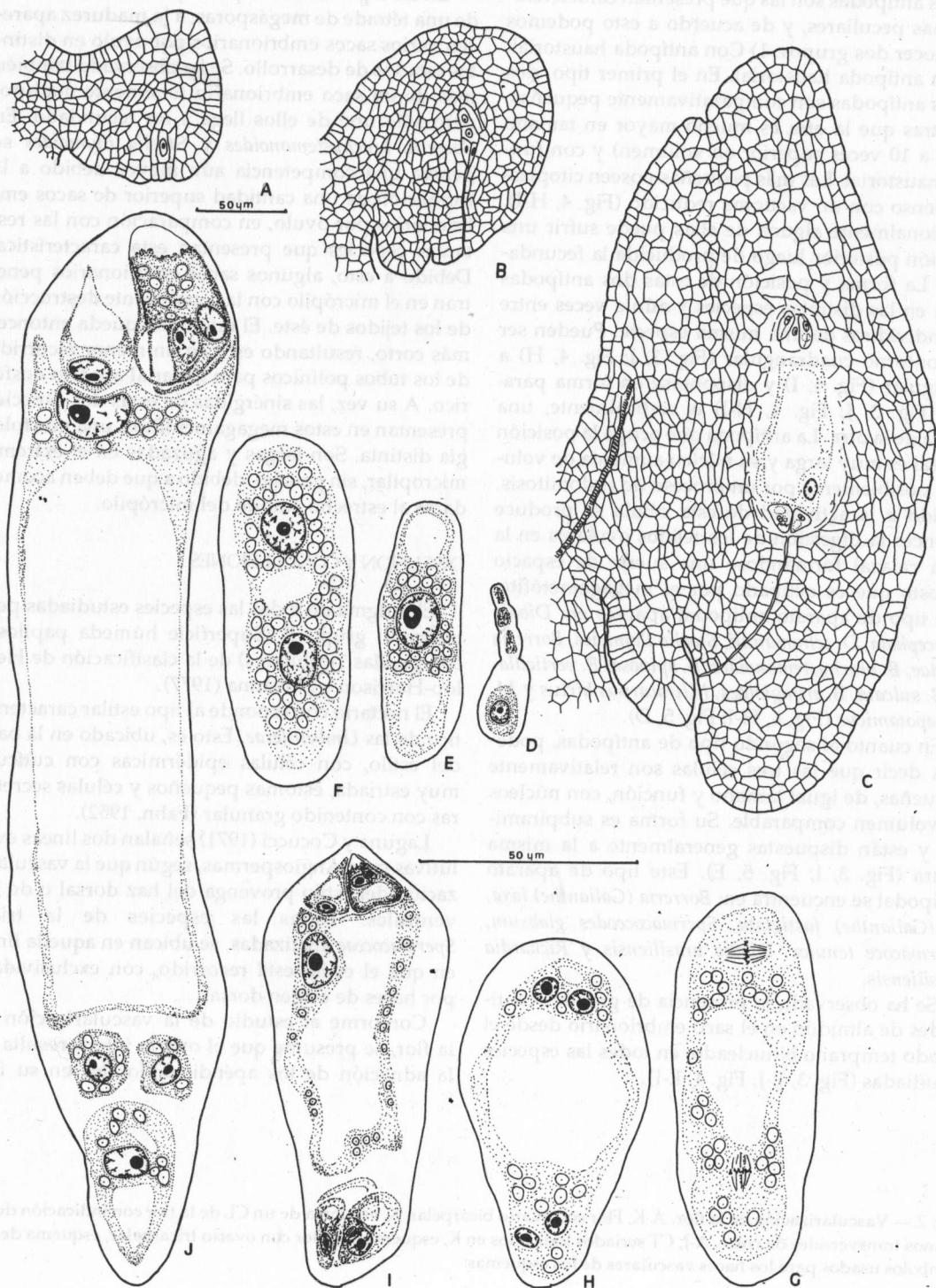
El nectario corresponde al tipo estilar característico de las *Umbelliferae*. Esto es, ubicado en la base del estilo, con células epidérmicas con cutícula muy estriada, estomas pequeños y células secretoras con contenido granular (Fahn, 1952).

Laguna y Cocucci (1971) señalan dos líneas evolutivas para Angiospermas, según que la vascularización del estilo provenga del haz dorsal o de los ventrales. Todas las especies de la tribu *Spermaceae* analizadas, se ubican en aquella línea en que el estilo está recorrido, con exclusividad, por haces de origen dorsal.

Conforme al estudio de la vascularización de la flor, se presume que el ovario ínfero resulta de la adnación de los apéndices florales en su for-

Fig. 2.— Vascularización de la flor. A-K, Flor con ovario bicarpelar. K, esquema de un CL de la flor con indicación de los planos transversales de corte. A-J, CT seriados indicados en K, esquemas. L, Flor con ovario tricarpelar, esquema de CT. Símbolos usados para los haces vasculares de los esquemas:





ma extrema (Eames, 1931; Douglas, 1944; Puri, 1952).

La estructura extrategumentaria que poseen los óvulos de esta tribu aparece bajo diversos nombres y definida en formas distintas (Pfeiffer, 1911; Lloyd, 1902; Fagerlind, 1937; Kapil y colaboradores, 1980). La terminología usada presenta confusiones, debido a que muchos autores utilizan la denominación sin estudiar la ontogenia. Según Lloyd (1902), esta estructura en las Rubiáceas se inicia como una protuberancia cerca del rafe, en estados de desarrollo muy tempranos. Farooq (1959) determinó lo mismo para *Borreria hispida*. De acuerdo a lo observado en este estudio se corrobora la idea de Lloyd y de Farooq en las especies estudiadas.

En este trabajo se consideró apropiado conservar el término estrofiolo, redefiniéndolo como una estructura extrategumentaria, que aparece tempranamente en la ontogenia del óvulo como una expansión del rafe. Su función se relaciona con la guía del tubo polínico a modo de un obturador, por lo menos hasta el estadio que corresponde con el megagametófito maduro, ya que esta estructura continúa diferenciándose durante el desarrollo de la semilla.

Fagerlind en 1937 se ocupó de la embriología de las Rubiáceas sentando las bases para toda revisión posterior. Aunque se trata de una obra extensa, falta información sobre las especies, que se estudiaron en este trabajo. Este autor estableció seis tipos de óvulos para la familia Rubiaceae, de acuerdo al desarrollo del tejido arqueosporico y de la epidermis nucelar. Con el estudio de estas 17 especies se ha ampliado el espectro de los seis tipos de óvulos establecidos por Fagerlind (1937), con el agregado de un nuevo tipo que viene a constituir un caso intermedio entre los tipos *Bouvardia* y *Rubia*. Las características específicas de los siete tipos son las siguientes (Fig. 25):

1) *Tipo Phyllis*: Una o dos arqueosporas. Epidermis nucelar plana, de convexa. Es la más frecuente en la familia, según lo que se conoce hasta el momento.

2) *Tipo Bouvardia*: 3-4 arqueosporas. Epidermis nucelar plana, de pocas células, generalmente tres.

3) *Tipo Vaillantia*: numerosas arqueosporas. Epidermis nucelar plana de muchas células.

4) *Tipo Oldenlandia*: 3-4 arqueosporas. Epidermis nucelar generalmente de 1 - 2 células.

5) *Tipo Houstonia*: 3-4 arqueosporas. Sin epidermis nucelar ni canal micropilar.

6) *Tipo Rubia*: 3-4 arqueosporas. Epidermis nucelar muy especializada, con pocas células piramidales muy alargada. Como resultado, el micrópilo está más o menos desarrollado.

7) *Tipo Mitracarpus*: 1 a 3 arqueosporas. Epidermis nucelar algo especializada, con 3 células piramidales más cortas que en el tipo anterior. Micrópilo bien desarrollado.

Este séptimo tipo se encuentra presente en las especies estudiadas en este trabajo y ha sido denominado *Mitracarpus* dado que *M. hirtus* fue la primera especie en la que se observó.

El análisis de los distintos tipos de óvulos a la luz de la nueva información proporcionada en este trabajo permite hacer una propuesta distinta de la de Fagerlind (1937) en relación a la evolución del megasporangio. Se coincide con Fagerlind en que el tipo *Phyllis* sería el más primitivo dado que la nucela representada principalmente por la epidermis, sobresale por encima de la calaza y es recubierta, sin soldarse, por el grueso tegumento. Su principal tendencia evolutiva se manifiesta en una progresiva inclusión del tejido arqueosporico en el seno de la calaza. Esto trae apareado una correspondiente reducción de la epidermis nucelar, manifiesta en la serie representada por los tipos: *Vaillantia*, *Bouvardia* y *Oldenlandia*, para culminar en la desaparición total de la epidermis nucelar en el tipo *Houstonia*, donde, según Fagerlind, se halla además, cerrado el canal micropilar (Fig. 6).

Una segunda tendencia ocurre paralelamente a partir del tipo *Bouvardia*, que consiste en un progresivo cambio morfológico de las tres células de la epidermis nucelar, las cuales se tornan piramidales. Esto se visualiza en el pasaje *Mitracarpus-Rubia* (Fig. 6).

La principal discordancia con el sistema de Fagerlind reside en la ubicación de *Vaillantia*, que es considerada por ese autor como una rama terminal del plan evolutivo, mientras que en este trabajo ocupa una posición de transición entre el tipo *Phyllis* y *Bouvardia*. Una segunda diferencia está en que la primera divergencia según Fagerlind ocurre entre los tipos *Bouvardia* y *Vaillantia*. La divergencia sería a partir de *Bouvardia* hacia *Rubia*, pero con el tipo intermedio *Mitracarpus* haciendo enlace entre ambos (Fig. 6).

Fig. 3.— A-I. *Richardia brasiliensis*, megagametogénesis. A-C, ontogenia del óvulo; D, tétrade de megásporas; E, megáspora desarrollada; F, saco embrionario 2-nucleado; G, saco embrionario en su segundo ciclo cariocinético mitótico, metafase; H, saco embrionario 4-nucleado; I, megagametófito maduro, antípodas cortas; J, *Borreria sulcata*, megagametófito maduro, antípoda calazal de tipo intermedio, con tendencia a haustorial.

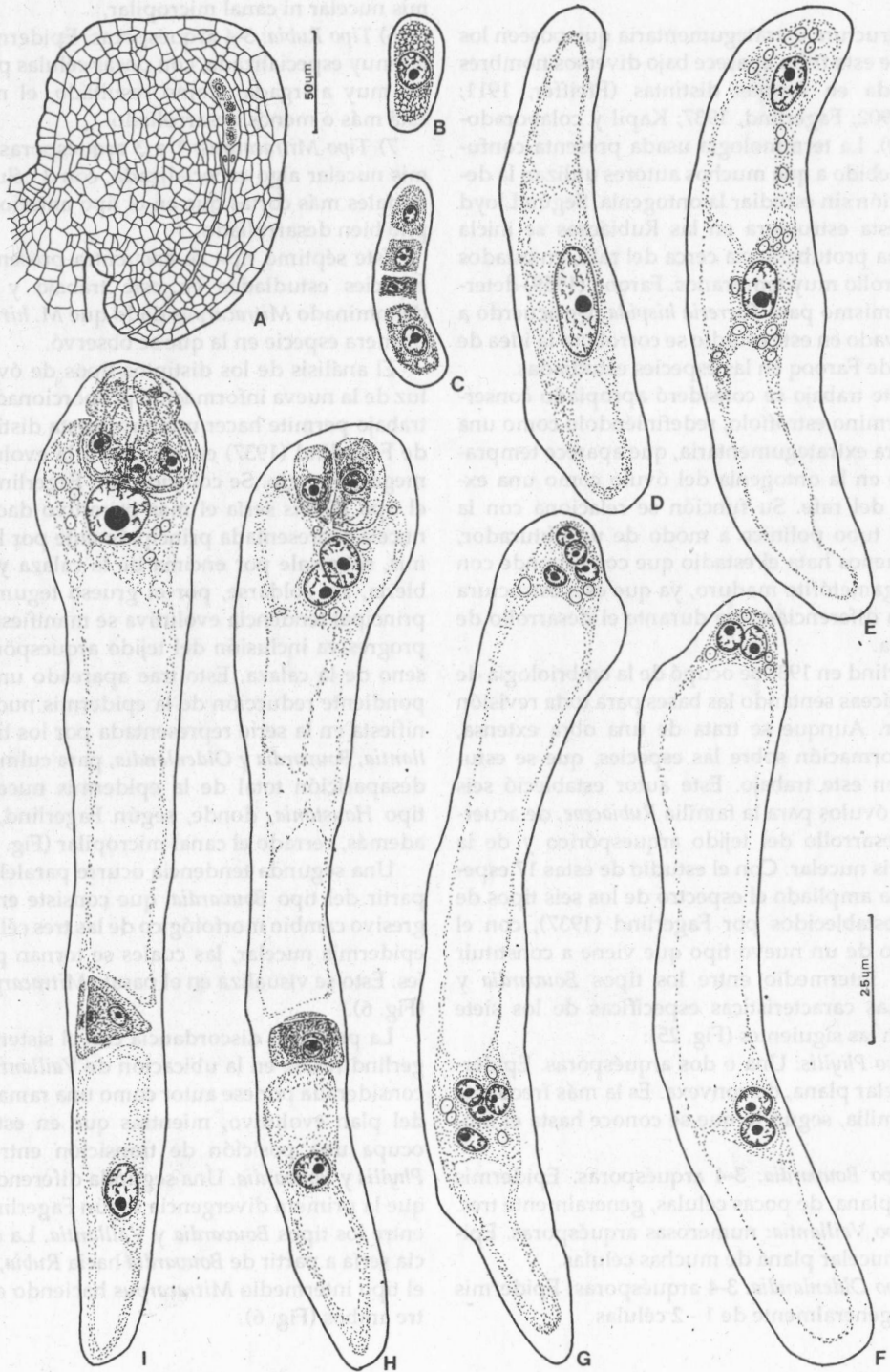


Fig. 4.— A-I- *Mitracarpus hirtus*, megagametogénesis: A, óvulo joven en CL; B, célula madre de las megásporas; C, tétrade de megásporas; D, saco embrionario 1-nucleado; E, saco embrionario 2-nucleado; F, saco embrionario 4-nucleado; G, saco embrionario 8-nucleado; H, megagametófito joven; I, megagametófito maduro, antípoda calazal larga, haustorial.

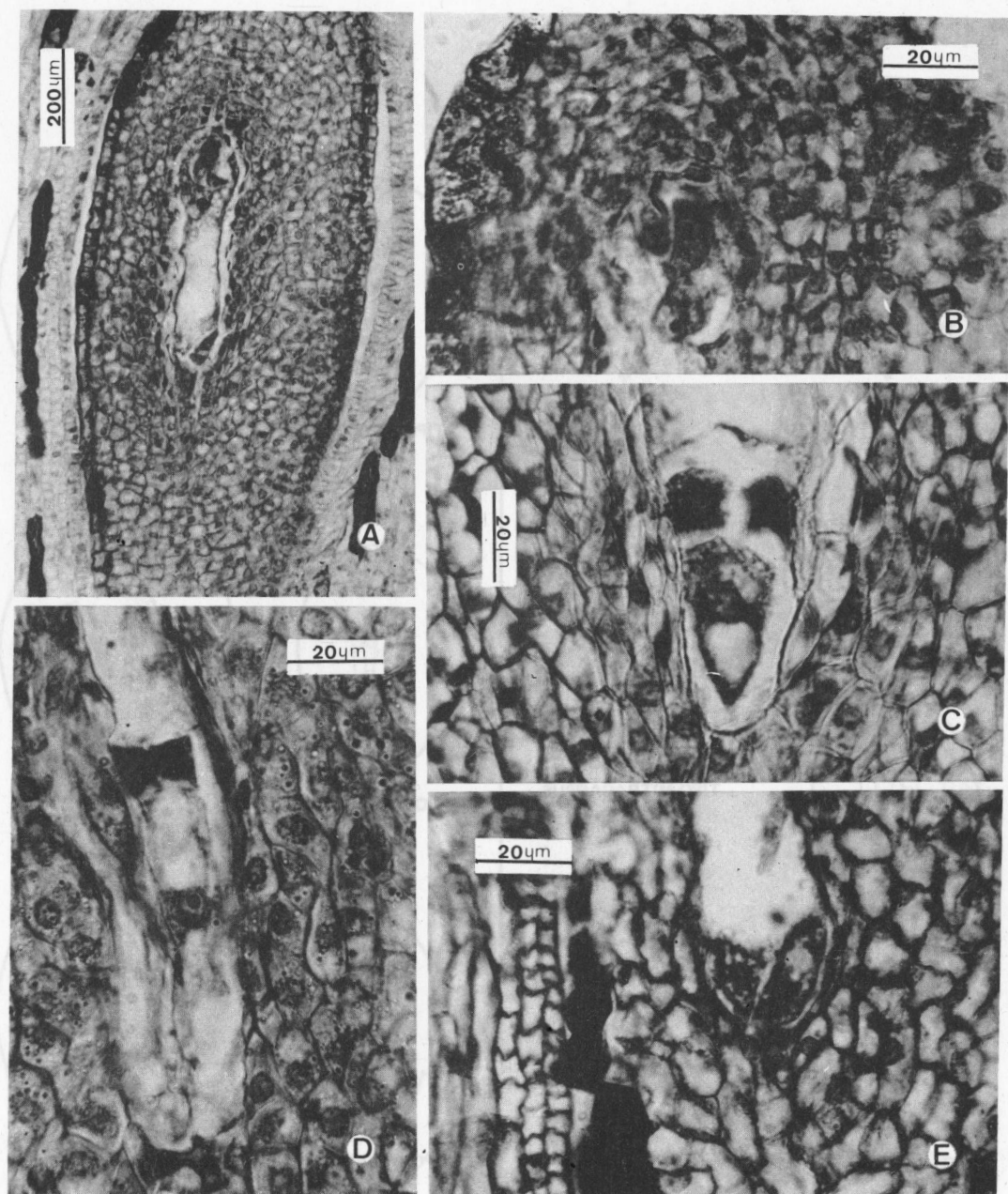


Fig. 5.— A-E. Megagametófitos: A, *Diodia dasycephala*, megagametófito 7-celular; B, *Mitracarpus hirtus*, aparato oosérico, C-E, antípodas; C, *Borreria sulcata*; D, *Borreria nelidae*; E, *Spermaceodes glabrum*.

Un asunto de interés, es el referido a la naturaleza del micrópilo en relación al progresivo avance de la calaza y la reducción del tegumento, según se indica por las áreas grisadas del esquema propuesto, hasta culminar con la virtual desaparición del tegumento (Fig. 6).

Farooq (1959), con el estudio de *Borreria hispida*, establece un nuevo tipo de óvulo intermedio entre *Oldenlandia* y *Bouvardia*, teniendo en cuenta que el arquesporio y la epidermis nucelar son usualmente uni-celulares y ocasionalmente bi-celulares. Este autor, no tiene en cuenta la forma de dichas células

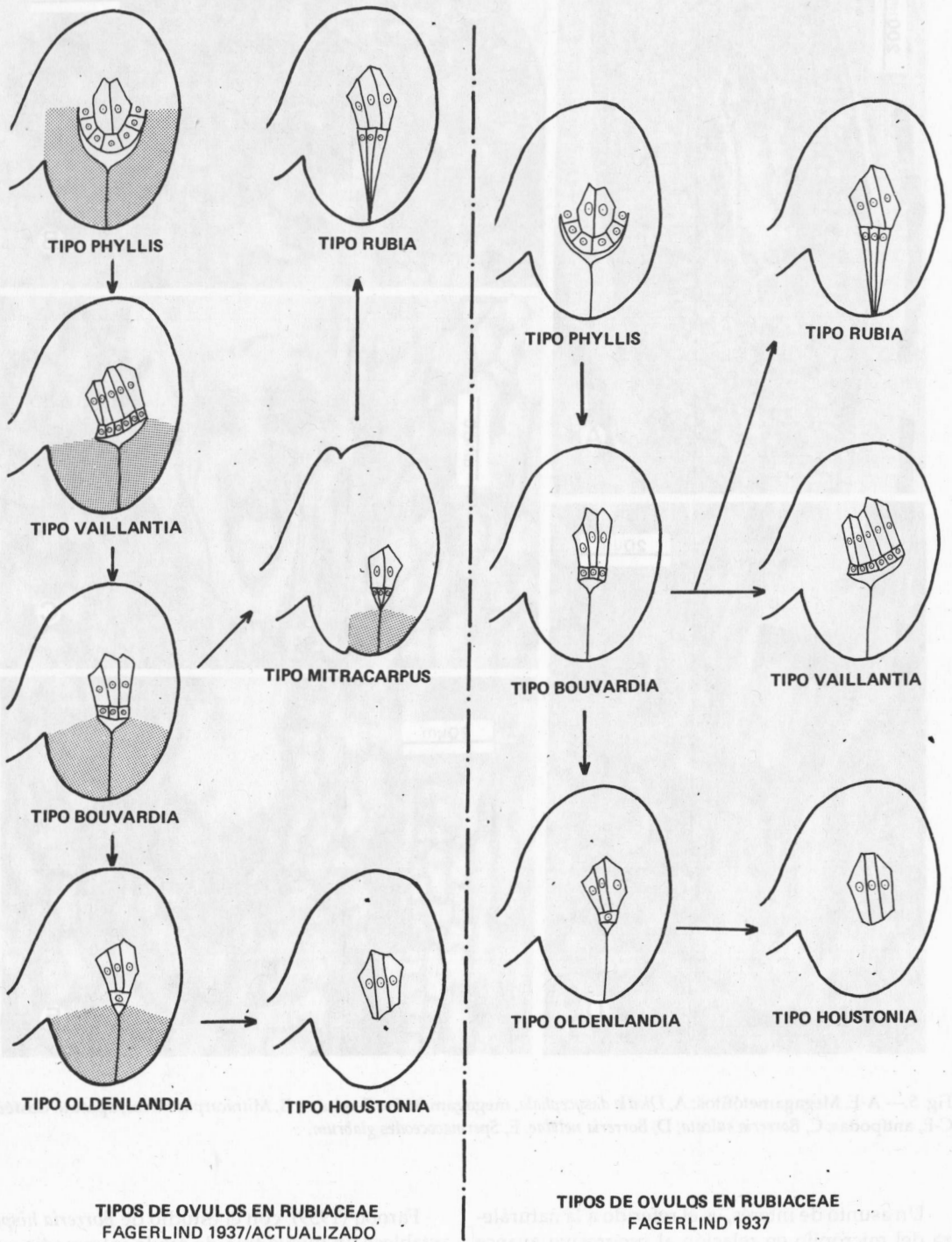


Fig. 6.— Comparación esquemática de óvulos en *Rubiaceae*, según Fagerlind (1937) y actualizado.

epidérmicas, de manera que el nuevo tipo establecido por él no se lo considera por ahora dentro del esquema general propuesto en este trabajo.

El desarrollo de varias arqueósporas y consecuentemente varios sacos embrionarios fue citado por Fagerlind (1937) para *Asperula*, *Putoria*, *Crucianella*, *Rubia*, *Vaillantia*, *Callipeltis*, *Sherardia* y *Galium*. Fagerlind observó en *Galium* que células arqueóspóricas no reducidas actúan como megásporas. En cambio en *Oldenlandia* vio dos sacos embrionarios jóvenes en el mismo óvulo que podrían provenir de una misma tétrade. En las especies estudiadas en este trabajo se observó en varios casos la presencia de más de una célula arqueóspórica. En general, una sólo de ellas sufre meiosis y da lugar al saco embrionario. En *Borreria brachyemonoides*, *B. nelidae* y *Staelia thymoides*, se observó la formación de varios sacos embrionarios por óvulo en distintos estados de desarrollo, como consecuencia de la meiosis en varias arqueósporas distintas, sin embargo, uno sólo de ellos es funcional.

La tipología de los megagametófitos ya fue considerada por Fagerlind (1937) quien reconoce cinco tipos según las características del aparato antipodal:

1) *Tipo Richardsonia*: tres antípodas cortas desarrolladas en forma semejante, y dispuestas en forma más o menos simétrica, una al lado de otra.

2) *Tipo Leptodermis-Cephalanthus*: las tres antípodas son más o menos largas. El carácter puede variar.

3) *Tipo Vaillantia*: es un aparato antipodal de larga vida. Consta de tres células de las cuales la calazal es extremadamente larga y las otras dos pequeñas.

4) *Tipo Phyllis*: tres células, la calazal es larga y las dos superiores pequeñas, adquieren forma globosa. La antípodal calazal puede llegar a tener ocho núcleos y las dos superiores cuatro núcleos cada una.

5) *Tipo Crucianella*: el aparato antipodal consta de más de tres células.

En el presente trabajo se comprobó que *Diodia dasycephala*, *D. schumannii*, *Staelia thymoides*, *Mitracarpus hirtus*, *M. megapotamicus*, *Borreria brachyemonoides*, *B. nelidae*, *B. eryngioides*, *B. spinosa* y *B. verticillata* coinciden con el tipo *Vaillantia* y que *Diodia brasiliensis*, *Borreria (Galianthe) laxa*, *B. (Galianthe) fastigiata*, *Spermacoceodes glabrum*, *Spermacoce tenuior* y *Richardia brasiliensis* corresponden al tipo *Richardsonia*. Se puede hacer notar que *Borreria sulcata* presenta un aparato antipodal, que si bien podría corresponderse con el tipo *Vaillantia*, la antípodal calazal no está tan profundamente alargada. Su tamaño es tan sólo dos veces el de las más pequeñas (Fig. 3, J; Fig. 6, C).

Lloyd (1902), describe la antípodal calazal en el caso del tipo *Vaillantia*, como un haustorio, mientras que Fagerlind (1937) niega haberlo visto así. De lo observado en este trabajo se deduce que dicha antípodal concuerda con las características citológicas y morfológicas correspondientes a las de una célula haustorial (Crété, 1951).

Tal como se dijo en la Introducción, este trabajo constituye la primera parte del estudio embriológico realizado en la tribu *Spermacoceae*. Por lo tanto, los datos aquí presentados, serán nuevamente considerados en la tercera y última entrega, para la discusión filogenética.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a los Doctores E. Ancibor y A. E. Cocuci por su muy valiosa dirección, y a la Prof. N. Bacigalupo por la colección y determinación de la mayor parte de los materiales, por el aporte bibliográfico brindado y por su constante apoyo en la discusión de diversos problemas.

BIBLIOGRAFIA

- CRÉTÉ, P. 1951. Répartition et intérêt phylogénétique des albumes a formation haustoriales chez les Angiospermes et plus particulièrement chez les Gamopétales. *Ann. Sc. Nat. Bot.* 2 Ser. 12: 131-191. f. 1-40.
- CRONQUIST, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press. New York 1262 pp.
- DIZEO DE STRITTMATTER, C. G. 1979. Modificación de una coloración safranina-fast green. *Bol. Soc. Arg. Bot.* XVIII (3-4): 121-122.
- 1980. Coloración con "violeta de Cresyl". *Bol. Soc. Arg. Bot.* XIX (1-2): 273-276.
- DOUGLAS, C. E. 1944. The inferior ovary. *Bot. Rev.* 10: 125-86.
- EAMES, A. J. 1931. The vascular anatomy of the flower with refutation of the theory of carpel polymorphism. *Am. J. Bot.* 18: 147-88.
- FAGERLIND, F. 1936. Die Embryologie von *Putoria*. *Sv. Bot. Tidskr.* 30: 362-372.
- 1937. Embryologische, zytologische und bestäubungs-experimentelle Studien in der Familie *Rubiaceae* nebst Bemerkungen über einige Polyploiditätsproblem. *Acta Horti Berg.* 11: 195-470.
- FAHN, A. 1952. On the structure of floral nectaries. *Bot. Gaz.* 113: 464-470.
- FAROOQ, M. 1969. The embryology of *Borreria hispida* (*Spermacoce hispida*): a reinvestigation. *J. Indian. Bot. Soc.* 38: 280-287.
- FUKUOKA, N. 1978. Studies in the floral anatomy and Morphology of *Rubiaceae*. I. *Hedyotidae* (*Anotis*, *Argostemma* and *Clarkella*) *Acta Phytotaxon Geobot.* 29 (1-5): 85-94.
- FUKUOKA, N. 1979. Studies in the floral anatomy and morphology of *Rubiaceae*. I. *Hedyotideae* (*Ophiorrhiza*

and Pentas). *Acta Phytotaxon Geobot.* 30 (1-3): 85-100.

HESLOP-HARRISON, Y. and K. R. SHIVANNA. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* (Lond.) 41 (176): 1233-1258.

KAPIL, R. N. J. BOR and F. BOUMAN. 1980. Seed appendages in Angiosperms. *Bot. Jahrb. Syst.* 101 (4): 555-573.

LAGUNA, I. G. y A. E. COCUCCI, 1971. El ovario, el óvulo y el megagametófito de *Colletia spinosissima* (Rhamnaceae). *Kurtziana* 6: 53-62, f. 1-3.

LLOYD, F. E. 1902. The comparative embryology of the Rubiaceae. *Mem. Torrey Bot. Club* 8: 1-112.

— 1904. The pollen tube in the Cucurbitaceae and Rubiaceae. *Torreya* 4: 86-91.

— 1905. The course of the pollen tube in *Houstonia*. *Torreya* 5: 83.

PFEIFFER, A. 1911. Die Arillargebilde der Pflanzensamen. *Englers Bot. Jahrb.* 13.

PURI, V. 1952. Floral anatomy and inferior ovary. *Phytomorphology* 2: 122-129.

RAMAN, S. S. 1954. Gametogenesis and fertilization of *Stephegyne parviflora*. *Agra Univ. J. Res. (Sci.)* 3: 343-348.

SHIVARAMIAH, G. and P. S. GANAPATHY, 1961. A contribution to the embryology of *Knoxia corymbosa*. *Current Sci.* 30: 190-191.

SHIARAMIAH, G. and R. C. DUTT. 1964. A contribution to the embryology of *Rondeletia amoena*. *Current Sci.* 33: 280-281.

SIDDIQUI, S. A. and S. B. SIDDIQUI. 1968. A contribution to the embryology of *Borreria stricta* Linn. *Beitr. Biol. Pfl.* 44: 353-360.

VERDCOURT, B. 1958. Remarks on the Classification of the Rubiaceae. *Bull. Jard. Bot. de L'Etat. Bruxelles.* 28: 250.261.

WEBERLING, F. 1977. Beiträge zur Morphologie der Rubiaceen-Infloreszenzen *Ber Deutsch. Bot. Ges. Bd.* 90, S: 191-209.