

ESTUDIOS EMBRIOLOGICOS Y PALINOLOGICOS
EN *ASTRAGALUS* (*LEGUMINOSAE*)¹

POR SARA MALDONADO DE MAGNANO

SUMMARY

Astragalus carinatus (H. et A.) Reiche and *A. parodii* Johnst. (Sect. *Astragalus*), as well as *A. monticola* Phil., a representative of Sect. *Phaca* (L.) A. Gray, have been studied from the embryological and palynological points of view. The main conclusions are the following ones:

1. The anther wall originates according to the Dicotyledonous type, and comprises 4 layers: epidermis, endothecium, one middle layer and a glandular tapetum that remains uninucleate. Delimitation of microspores is simultaneous and tetrahedral tetrads are formed. Pollen grains are isopolar, radiosymmetric, prolate and 3-colporate with alongate pores. The exine is reticulate, but the apertural membranes are smooth in *A. monticola*, and verrucate in the other 2 species.

2. Mature ovules are campylotropous, crassinucellate and bitegmic; initiation of both integuments is dermal, and the micropyle is formed by the exostome and the mesostome. After fertilization, the ovules become amphitropous and the endothelium undergoes differentiation.

3. The archesporium may be one to many celled, but only one cell is the site of meiosis. There are several patterns of megaspores arrangement: linear or T-shaped tetrads, or one row of three celles formed by failure of meiosis II in the micropylar member of the dyad. The parietal tissue is 2 or 3-layered and some non-functional sporogeneous cells can contribute to its formation.

4. The chalazal or subchalazal megaspore produce an 8-nucleate embryo sac which develops according to the *Polygonum* type.

5. Fertilization is porogamous and no damage of the synergids occurs. Several callose plugs were seen in the pollen tubes.

6. The segmentation of the apical cell, during the embryogenesis, follows the pattern described by Souèges for *Trifolium minus*. The hypophysis may be originated by the apical or the basal cell.

7. The endosperm is nuclear, but its micropylar part becomes cellular when the embryo reaches the globular state; on the contrary, the chalazal portion remains free nuclear until the seeds are mature.

8. The structure of the seed is typical for *Papilionoideae*, but the funicular aril and the recurrent vascular bundles are absent. Mature seeds are albuminous, with an aleurone layer surrounding a mucilaginous tissue with thickened cell walls and no cell lumina.

¹ Esta investigación es parte del trabajo presentado a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Universidad Nacional de Córdoba), para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Aceptado para su publicación: 12-X-1981.

INTRODUCCION

Con sus 1600 especies, *Astragalus* figura entre los 3 géneros más numerosos del Reino Vegetal y pertenece a *Galegeae*, una de las tribus reconocidas por Taubert (1894) para Leguminosas Papilionoideas. De distribución casi universal, se halla representado en Argentina por unas 46 especies que crecen principalmente en la zona occidental andina y patagónica (Burkart, 1952).

Muchas de sus especies son tóxicas para el ganado; la toxicidad es producida por sustancias nitrogenadas que actúan destruyendo el sistema nervioso central de los rumiantes que las ingieren, llevándolos en algunos casos a la parálisis y la muerte (William and Barneby, 1977).

A pesar de su importancia numérica y económica, la información disponible sobre aspectos embriológicos y palinológicos en *Astragalus* es muy escasa. Estudios embriológicos fueron realizados en *A. dispersum* por James (1950) y en *A. glycyphyllus* por Crété (1951) y Bijok *et al.* (1972). Por otra parte, existen referencias sobre el tipo de óvulo que caracteriza al género (Bocquet et Bersier (1959) y sobre las particularidades del tapete (Buss and Lersten, 1975).

Investigaciones palinológicas sólo se llevaron a cabo con microscopio fotónico en 2 especies de Argentina, *A. garbancillo* y *A. pehuenches* (Markgraf and D'Antony, 1978), en una de Chile, *A. chamissonis* (Heusser, 1971), en 2 del Mediterráneo, *A. hamosus* y *A. purpureus* (Planchais, 1964) y en 6 de la India, *A. jacquemontii*, *A. nicharensis*, *A. subumbellata*, *A. longicaulis*, *A. himalayanus* y *A. contortuplicatus* (Vishnu-Mittre and Sharma, 1962).

Las discrepancias existentes en algunos hallazgos, aparte de la escasa información sobre *Astragalus*, me decidieron a encarar el presente estudio en *A. carinatus* y *A. parodii* de la sección *Astragalus* y en *A. monticola* de la sección *Phaca* (L.) A. Gray. Consiste en un análisis completo de la organización y desarrollo de los gametófitos y de la semilla e incluye, además, observaciones con microscopio electrónico de barrido (MEB) sobre particularidades del polen.

MATERIAL Y METODO

La mayor parte de los estudios se hicieron sobre material coleccionado en varios viajes que, con tal fin, se realizaron entre los años 1977 y 1979.

Los fijadores utilizados para su conservación fueron, una mezcla 3:1 de alcohol etílico y ácido acético glacial, o FAA.

Gran parte de la investigación está basada en observaciones de cortes seriados; para obtenerlos, se deshidrató el material en una serie

de alcohol etílico-xilol y se incluyó en "Paraplast"; las secciones microtómicas, entre 7 y 18 micras de espesor, fueron teñidas con la triple coloración hematoxilina-safranina-verde rápido (Johansen, 1940).

El análisis palinológico se llevó a cabo en materiales preservados en líquidos fijadores. Las mediciones se realizaron en granos sin tratamiento especial mientras que, para el reconocimiento de las aberturas, se acetolizó el material según la técnica de Erdtman (1952). Dichas observaciones se practicaron con microscopio fotónico, utilizándose el microscopio electrónico de barrido para estudiar la ornamentación de la esporodermis. La nomenclatura palinológica empleada es la propuesta por Erdtman (1969) o Faegri and Iversen (1964).

Los tubos polínicos se observaron en gineceos transparentados con hidróxido de sodio (3-5 %), los que luego fueron teñidos con azul de algodón.

Todos los dibujos son originales y, excepto los diagramáticos, los realicé con el auxilio de la cámara clara.

A continuación se cita el material estudiado y su procedencia:

Astragalus carinatus (H. et A.) Reiche: ARGENTINA. Prov. Córdoba. Dpto. Santa María: Proximidades de La Calera, E. Di Fulvio 321, 6-IX-73 (CORD). — Del mismo lugar, Maldonado 14, 30-XI-77 (CORD) y Maldonado 24, 17-XII-78 (CORD). — Dpto. Colón: Estancia El Silencio, Pampa del Cuadrado, Maldonado 8, 29-X-77.

Astragalus parodii Johnst.: ARGENTINA. Prov. Córdoba. Dpto. San Alberto: A 2 km del Hotel El Cóndor bajando hacia Copina, Maldonado y Ferrucci 6, 22-X-77 (CORD). — Del mismo lugar, Maldonado 21, 27-XII-78 (CORD).

Astragalus monticola Phil.: ARGENTINA. Prov. San Juan. Dpto. Iglesias: Ruta 150 (km 88/89), Peñasquito, entre Las Flores y Arrequeintín, A. T. Hunziker, Subils y Bernardello 23251, 11-I-79 (CORD).

OBSERVACIONES

Microsporangio. Microsporangénesis. Polén. — La pared de la antera joven cuyo origen coincide con el tipo característico para Dicotiledóneas (Davis, 1966), consta de 4 estratos celulares que, desde afuera hacia adentro son: epidermis, endotecio, un estrato parietal y el tapete. Este último es de tipo secretor y sus células se mantienen 1-nucleadas mientras persisten (Fig. 1 A).

Durante la microsporangénesis, primero el estrato parietal (Fig. 1 B) y luego el tapete (Fig. 1 E) son consumidos. Simultáneamente, las células del endotecio se vuelven más altas y desarrollan engrosamientos en sus paredes radiales y tangencial interna (Fig. 1 E, I, J, L). La epidermis, en cambio, no muestra mayores modificaciones.

En el momento de la dehiscencia, la pared de la antera está constituida sólo por la epidermis y el endotecio, a cuya pared tangencial interna quedan adheridos restos de los otros dos estratos (Fig. 1 I, J).

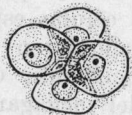
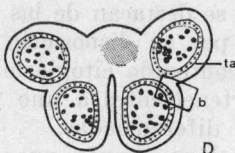
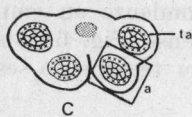
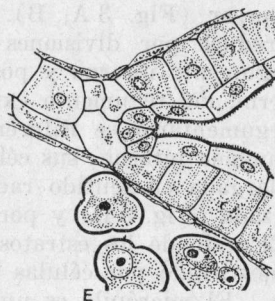
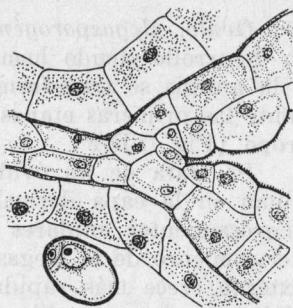
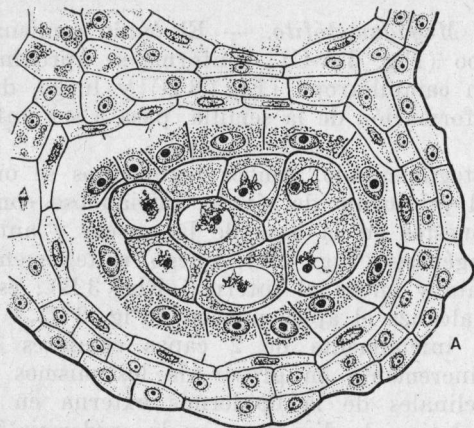
Los septos que separan los sacos polínicos son estrechos y, desde temprano, presentan células vacuolizadas y de paredes delgadas (Fig. 1 A). Al finalizar el desarrollo de la antera, dichas células mueren y ambos septos se retraen contra el conectivo, rompiéndose a la altura del estomio (Fig. 1 H, I). Allí el endotecio carece de engrosamientos y en la epidermis hay 2 o 3 células más pequeñas a través de las cuales se produce la abertura (Fig. 1 I).

Las células parenquimáticas del conectivo almacenan almidón antes de producirse la dehiscencia.

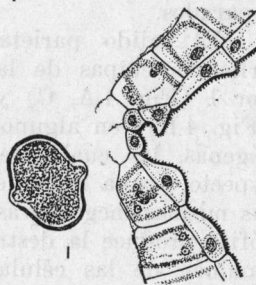
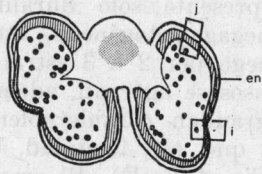
En la meiosis, la citocinesis es de tipo simultáneo y da lugar a tétrades tetraédricas (Fig. 1 F, G). El polen es 2-nucleado en anteras inmaduras pero no he podido comprobar si aún permanece en ese estado al producirse la dehiscencia.

Los granos de polen (Fig. 2) son isopolares, radialmente simétricos, subprolados, sistema NPC 345, con poros alargados y colpos de longitud aproximadamente igual a los 3/4 del eje polar. En *A. carinatus* y *A. monticola* el tamaño del grano varía entre 18 y 22 micras de diámetro ecuatorial y 22 a 26 micras de eje polar. En *A. parodii* los granos son algo mayores, 22 a 27,5 micras de diámetro ecuatorial por 26 a 33 micras de eje polar. La exina es reticulada en los mesocolpos, siendo las lúminas de diámetro menor a 1 micra; en los apocolpos se vuelve perforada por aumentar el grosor de los muros. La membrana apertural es verrugosa en *A. carinatus* y *A. parodii*; en *A. monticola*, por el contrario, es lisa.

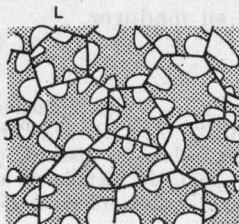
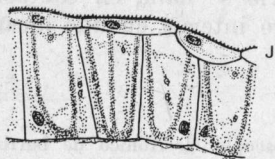
FIG. 1. — *Microsporangio* y *microsporogénesis* (*A. carinatus*, Di Fulvio 321). A: detalle de un corte transversal de antera, correspondiente al sector indicado en C; B: detalle de un corte transversal de antera en la zona de dehiscencia, correspondiente al sector indicado en D; C: corte transversal de antera joven; D: corte transversal de antera con granos de polen 2-nucleados y tapete secretor desarrollado; E: detalle de un corte transversal de antera en la zona de dehiscencia, mostrando el tapete en regresión y las células del endotecio con engrosamientos; F y G: tétrades tetraédricas; H: corte transversal de antera madura; I: detalle del corte transversal de antera, correspondiente a la zona de dehiscencia marcada en H; J: detalle de un corte transversal de antera, correspondiente a la zona indicada en H; K: corte transversal de antera luego de producida la dehiscencia y la liberación de los granos de polen; L: células del endotecio vistas desde la pared tangencial interna engrosada. *Aumentos*: la escala de 250 micras corresponde a C, D, H, K; la de 25 micras superior a A, B, E, F, G, I, J; la de 25 micras inferior a L. *Abreviaturas*: en, endotecio; ta, tapete. *Simbolismo*. Cruces: tapete; rayado: endotecio; punteado grueso: engrosamientos de la pared del endotecio; punteado fino: hacecillo vascular del conectivo.



250 μm



25 μm



Ovulo. Megasporogénesis. Megagametófito. — El óvulo comienza su desarrollo siendo hemítropo (Fig. 3 A-C); conforme se aproxima a la antesis se transforma en campilótropo (Fig. 3 D) y luego, durante las primeras etapas de formación de la semilla, pasa a ser anfítropo (Fig. 7 D-F).

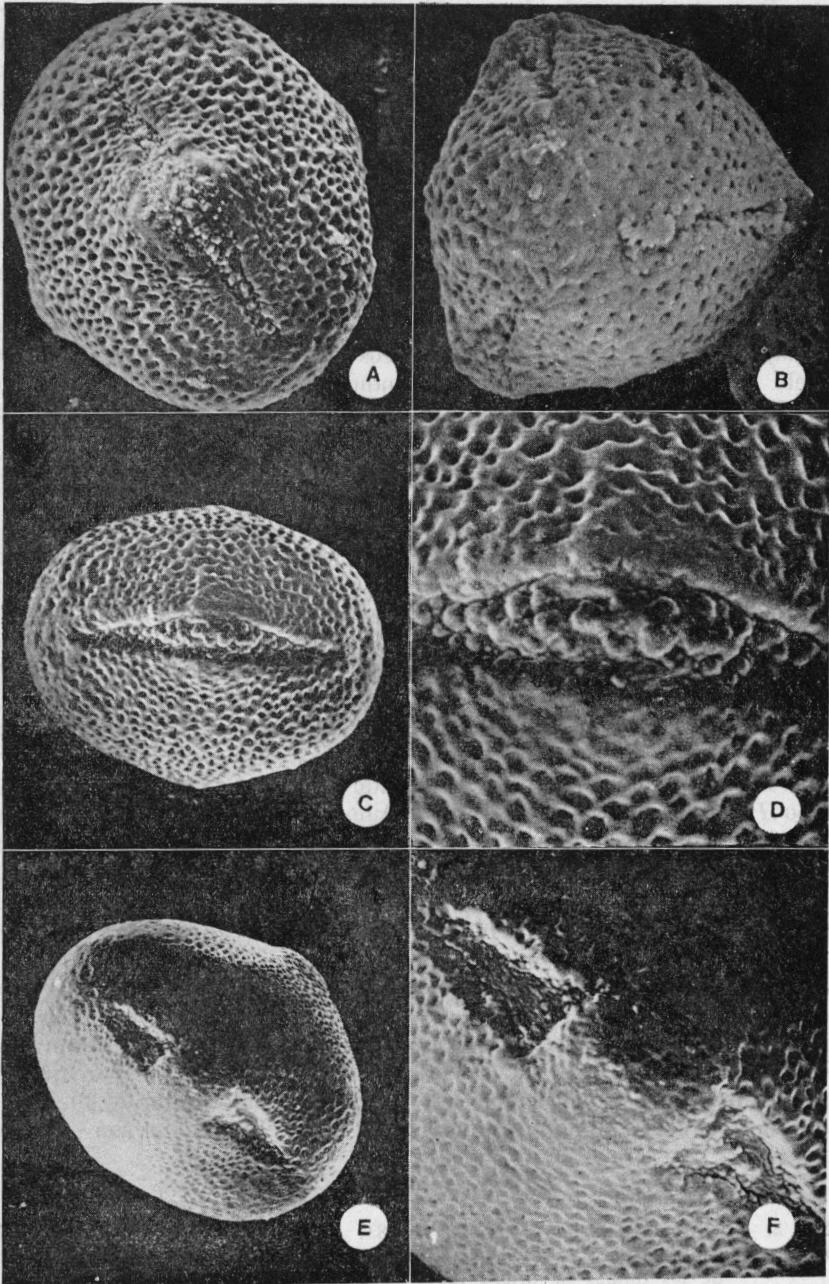
Se trata de un óvulo 2-tegmentado. Ambos tegumentos se originan en la capa dermal del primordio del óvulo, iniciándose como engrosamientos anulares dispuestos en la base de la nucela y antes del comienzo de la megasporogénesis (Fig. 3 A). Luego, el tegumento externo crece más rápidamente y cubre al interno (Fig. 3 B); este último, en su parte libre no alcanza el ápice nucelar (Fig. 3 C).

Los tegumentos constan inicialmente de 2 capas celulares de espesor (Fig. 3 A, B). El incremento en grosor de los mismos se produce por divisiones periclinales de la epidermis externa en el tegumento interno y por igual tipo de divisiones en la epidermis interna del tegumento externo (Fig. 3 C y D). Un endotelio o tapete tegumentario se diferencia de la epidermis interna del tegumento también interno; sus células se destacan de las restantes por su forma alargada en sentido radial, por su disposición al comienzo en empalizada (Fig. 3 D) y por el contenido citoplásmico denso Fig. 6 A-G). El resto de los estratos pertenecientes a uno y otro tegumento, está constituido por células poco diferenciadas.

El micrópilo es un canal en zig-zag que consta de un exostoma y un mesostoma (Fig. 3 D); no hay, en cambio, un verdadero endostoma ya que los bordes libres del tegumento interno permanecen separados.

El tejido parietal, presente sólo durante la esporogénesis y primeras etapas de la megagametogénesis, está constituido primero por 1 (Fig. 4 A, C) y luego por 2 a 3 estratos celulares de espesor (Fig. 4 B); en algunos casos se agregan, además, 1 a 3 células esporógenas, las cuales se agrandan considerablemente y adquieren un aspecto y una disposición que, con facilidad, las hace confundir con las mismas megásporas (Fig. 4 E, F). El crecimiento del megagametófito produce la destrucción gradual no sólo del tejido parietal, sino también de las células nucelares ubicadas lateralmente (Fig. 4 G, H, I, J, K), de este modo, el saco embrionario se halla en contacto directo con la epidermis interna del tegumento interno cuando alcanza su madurez.

FIG. 2. — *Polen*. Fotomicrografías obtenidas con microscopio electrónico de barrido (MEB). A y B: *A. Parodii* (Maldonado 21), A: vista ecuatorial, $\times 2000$; B: vista polar, $\times 2000$. C y D: *A. carinatus* (Maldonado 14), C: vista ecuatorial, $\times 2000$; D: detalle de una abertura, $\times 4000$; E. y F: *A. monticola* (Hunziker, Subils y Bernardello 23251), E: vista ecuatorial, $\times 2000$; F: detalle de una abertura, $\times 4000$.



Durante la antesis, la porción libre del funículo se presenta revestida de epidermis secretora, la cual continúa a la epidermis de igual naturaleza que cubre la placenta. Hasta en estados avanzados de la embriogénesis, se pueden observar tubos polínicos adheridos a ella.

El cuerpo basal que se desarrolla en las primeras etapas de la formación de la semilla, procede del rafe.

Cuando se inician los tegumentos en el óvulo, ocurre en la nucela una diferenciación preliminar. Aunque en esta etapa del desarrollo todas las células tienen características similares, se destaca un estrato externo que corresponde a la epidermis nucelar y por dentro la hipodermis y el tejido esporógeno, ambos de origen subdermal.

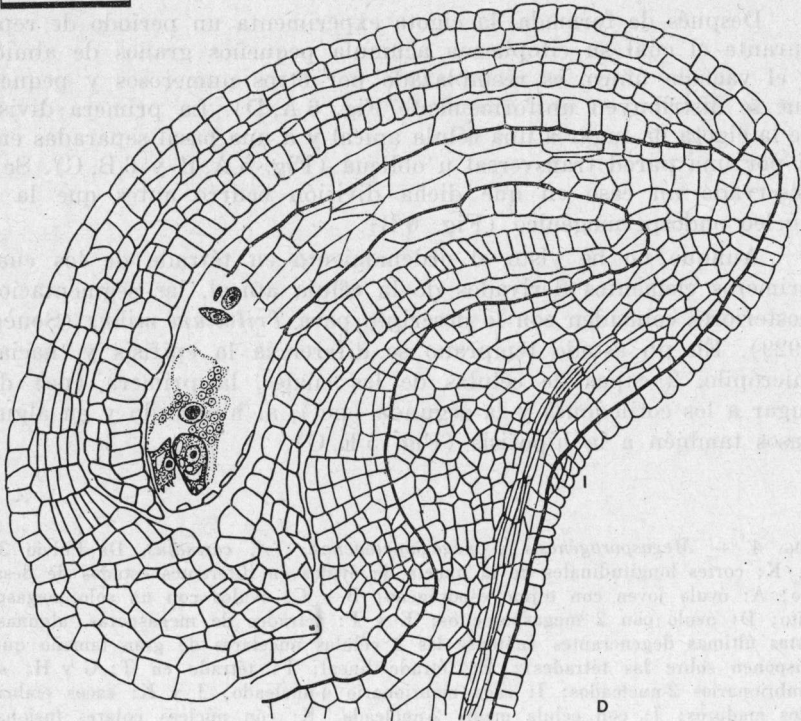
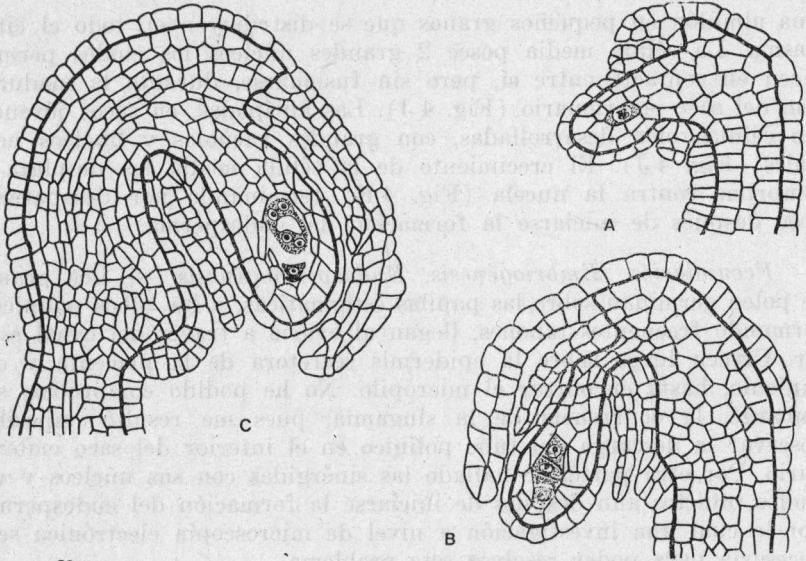
El tejido esporógeno está formado por varias células de mayor tamaño que las vecinas y con núcleos prominentes (Fig. 4 A); una suele agrandarse aún más, funcionando como célula madre de las megásporas (Fig. 4 B, C). A menudo se diferencian 2 y 3 células esporógenas (Fig. 4 D) pero siempre es una sola la que sufre meiosis; las otras, en cambio, se dividen mitóticamente y sus descendientes se confunden con las restantes células nucelares.

En la meiosis I, el megasporocito origina una díade cuya célula micropilar es a veces más pequeña y no vuelve a dividirse, terminando por degenerar. Generalmente la meiosis II se lleva a cabo en ambas células de la díade y de ella resultan 4 megásporas ordenadas en tétrades lineal o en T (Fig. 4 E, F). Si la meiosis II ocurre sólo en el componente calazal, resultan 3 células dispuestas en tríade lineal. En cualquiera de estos casos la megáspora funcional es indistintamente la calazal o la subcalazal. Las 2 megásporas micropilares, suelen degenerar de inmediato (Fig. 4 F).

El saco embrionario es 8-nucleado y responde por su origen al tipo *Polygonum*, es, por lo tanto, monospórico y se forma por tres divisiones sucesivas a partir de una megáspora funcional. El resultado de la primera mitosis es un cenocito de 2 núcleos (Fig. 4 G, H), que luego se hace de 4 (Fig. 4 I) y finalmente de 8 núcleos. La citocinesis ocurre en él con posterioridad, originándose así un típico gametófito 7-celular (Fig. 4 J).

Las sinérgidas, como es usual, poseen un núcleo ubicado hacia el extremo micropilar y un vacúolo notable hacia el calazal (Fig. 4 J, K); próximo a la antesis, estas células desarrollan un aparato filar conspicuo (Fig. 4 K). La oosfera tiene un volumen mayor que las sinérgidas; posee un vacúolo en el extremo micropilar y el núcleo desplazado hacia el polo opuesto (Fig. 4 K). En su interior se alma-

FIG. 3. — Óvulo (*A. carinatus*, Maldonado 8). A-D: cortes longitudinales de óvulos en sucesivos estados de desarrollo. La línea de trazo grueso indica el límite interno de los tejidos de origen dérmico. Abreviatura: l, futura lente.



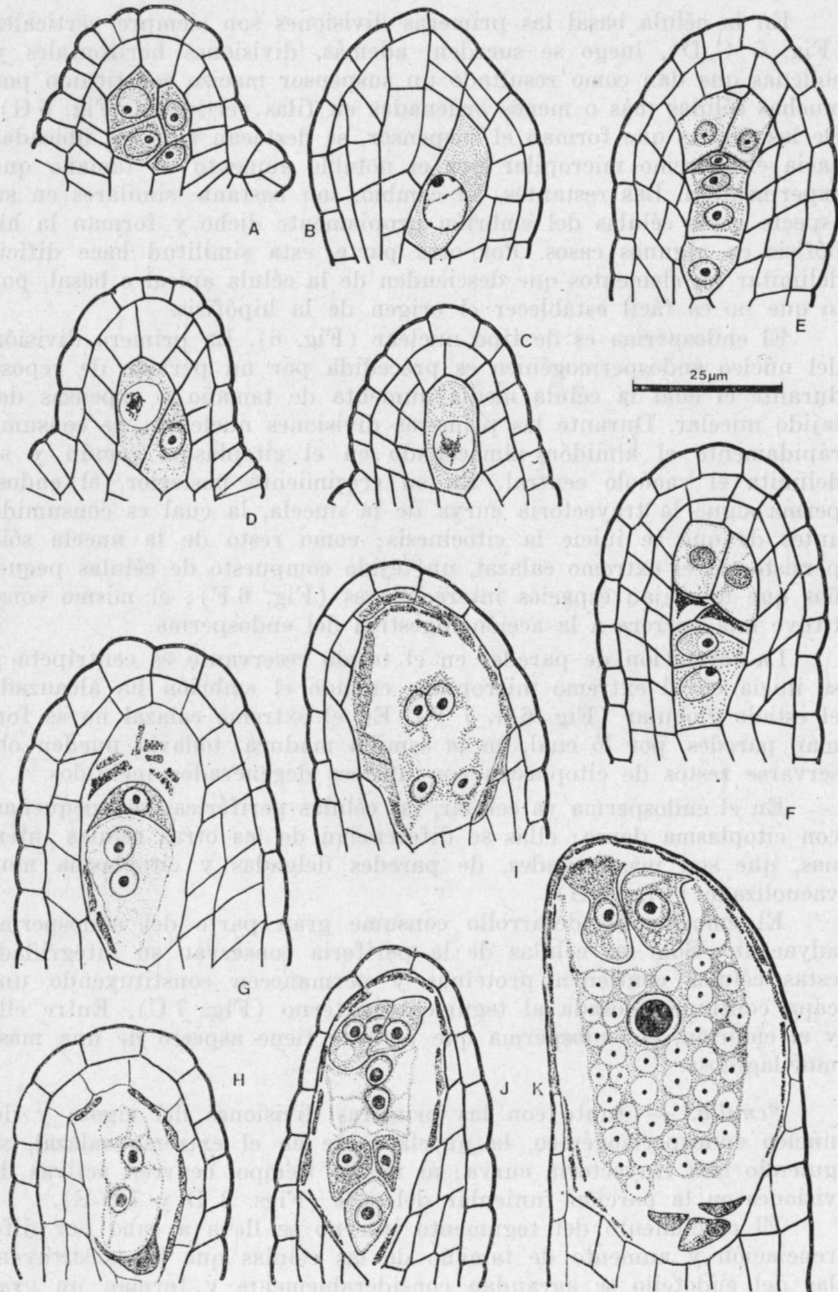
cena almidón en pequeños granos que se distribuyen en todo el citoplasma. La célula media posee 2 grandes núcleos los cuales permanecen en contacto entre sí, pero sin fusionarse, durante la maduración del saco embrionario (Fig. 4 J). Las antípodas, en sacos jóvenes, son células bien desarrolladas, con grandes vacúolos y núcleos normales (Fig. 4 J). El crecimiento de la célula media las desplaza y comprime contra la nucela (Fig. 4 K) terminando por desaparecer poco después de iniciarse la formación del endosperma.

Fecundación, Embriogénesis, Endospermogénesis. — Los granos de polen germinan sobre las papilas estigmáticas, y los tubos polínicos, formando frecuentes tapones, llegan al ovario a través del canal estilar. Crecen luego sobre la epidermis secretora de la placenta y del funículo, hasta encontrar el micrópilo. No he podido comprobar, sin embargo, la ocurrencia de la singamia, pues me resultó imposible observar la descarga del tubo polínico en el interior del saco embrionario. Por otra parte, he hallado las sinérgidas con sus núcleos y vacúolos intactos aún después de iniciarse la formación del endosperma, por lo cual una investigación a nivel de microscopía electrónica será necesaria para poder resolver este problema.

Después de formada, la cigota experimenta un período de reposo durante el cual su citoplasma acumula pequeños granos de almidón y el vacúolo único, es reemplazado por otros numerosos y pequeños que se distribuyen uniformemente (Fig. 6 A, D). La primera división de la cigota da lugar a una célula apical y a una basal separadas entre sí por una pared transversal u oblicua (Fig. 5 A; B y 6 B, C). Se ha observado un caso en que dicha división ocurre antes que la del núcleo endospermogénico (Fig. 6 B).

Aunque no he visto el ordenamiento en tétrade de los cuatro primeros elementos derivados de la célula apical, las segmentaciones posteriores coinciden con lo descripto para *Trifolium minus* (Souèges, 1929). En un estado temprano se diferencia la epífisis y, hacia el micrópilo, 2 capas de células de las cuales, la primera (pe) dará lugar a los cotiledones y la segunda (pe'), al hipocótilo y en algunos casos también a la hipófisis (Fig. 5 E, G).

FIG. 4. — *Megasporogénesis y megagametogénesis (A. carinatus, Di Fulvio 321)*. A-K: cortes longitudinales de la nucela de óvulos en diferentes estados de desarrollo; A: óvulo joven con tejido esporógeno; B y C: óvulos con un solo megasporocito; D: óvulo con 2 megasporocitos; E y F: tétrades de megásporas, algunas de estas últimas degenerantes (nótense las 2 células nucleares de gran tamaño que se disponen sobre las tétrades); E: tétrade lineal; F: tétrade en T; G y H: sacos embrionarios 2-nucleados; I: saco embrionario 4-nucleado; J y K: sacos embrionarios maduros; J: con célula media 2-nucleada; K: con núcleos polares fusionados.



En la célula basal las primeras divisiones son siempre verticales (Fig. 5 C, D), luego se suceden, además, divisiones horizontales y oblicuas que dan como resultado un suspensor macizo constituido por muchas células más o menos ordenadas en filas verticales (Fig. 5 G). De las células que forman el suspensor, se destacan aquellas ubicadas hacia el extremo micropilar por el notable aumento de tamaño que experimentan. Las restantes, en cambio, son bastante similares en su aspecto a las células del embrión propiamente dicho y forman la hipófisis en algunos casos. Por otra parte, esta similitud hace difícil delimitar los elementos que descienden de la célula apical o basal, por lo que no es fácil establecer el origen de la hipófisis.

El endosperma es de tipo nuclear (Fig. 6). La primera división del núcleo endospermogénico es precedida por un período de reposo durante el cual la célula media aumenta de tamaño a expensas del tejido nucelar. Durante las primeras divisiones nucleares, se consume rápidamente el almidón almacenado en el citoplasma común y se delimita el vacúolo central. En su crecimiento posterior, el endosperma sigue la trayectoria curva de la nucela, la cual es consumida antes de que se inicie la citocinesis; como resto de la nucela sólo persiste, en el extremo calazal, un tejido compuesto de células pequeñas que no dejan espacios intercelulares (Fig. 6 F); el mismo constituye una barrera a la acción digestiva del endosperma.

La formación de paredes en el tejido reservante es centrípeta y se inicia en el extremo micropilar, cuando el embrión ha alcanzado el estado globular (Fig. 6 G, 7 F). En el extremo calazal no se forman paredes, por lo cual, en la semilla madura, todavía pueden observarse restos de citoplasma con núcleos degenerados incluidos.

En el endosperma ya celular, las células periféricas son pequeñas, con citoplasma denso; ellas se diferencian de las otras células internas, que son más grandes, de paredes delgadas y citoplasma muy vacuolizado (Fig. 6 H).

El embrión en desarrollo consume gran parte del endosperma adyacente. Sólo las células de la periferia conservan su integridad; estas células contienen proteínas y permanecen constituyendo una capa continua adosada al tegumento externo (Fig. 7 C). Entre ella y el embrión, el endosperma que persiste tiene aspecto de una masa mucilaginoso.

Semilla. — Junto con las primeras divisiones del cigoto y del núcleo endospermogénico, la nucela crece en el extremo calazal, siguiendo una trayectoria curva; al mismo tiempo, ocurren activas divisiones en la porción funicular del rafe (Figs. 3 D y 7 D-E).

El crecimiento del tegumento interno se lleva a cabo por diferenciación y aumento de tamaño de las células que lo constituyen; las del endotelio se agrandan considerablemente y forman un gran

vacúolo hacia el exterior (Fig. 7 A), mientras que las restantes acumulan reservas. Con el desarrollo del endosperma nuclear, el tapete tegumentario inicia su actividad digestiva y consume el almidón almacenado en las demás células. Finalmente, todo el tegumento interno degenera (Fig. 7 B) y termina por desaparecer, sin dejar vestigios en la semilla madura (Fig. 7 C).

En el tegumento externo, las células de la epidermis externa se dividen únicamente en sentido radial, dando lugar a un estrato empalizada (Figs. 3 D y 7 A-C); sólo en la zona del rafe, correspondiente a la futura "lente" (Fig. 3 D) ocurren, además, divisiones tangenciales que se inician antes de la fecundación. Parte de las células de la capa hipodérmica externa y de la epidermis interna, se dividen también periclinalmente, incrementando el espesor de este tegumento (Fig. 7 A, B). Las de los restantes estratos, especialmente

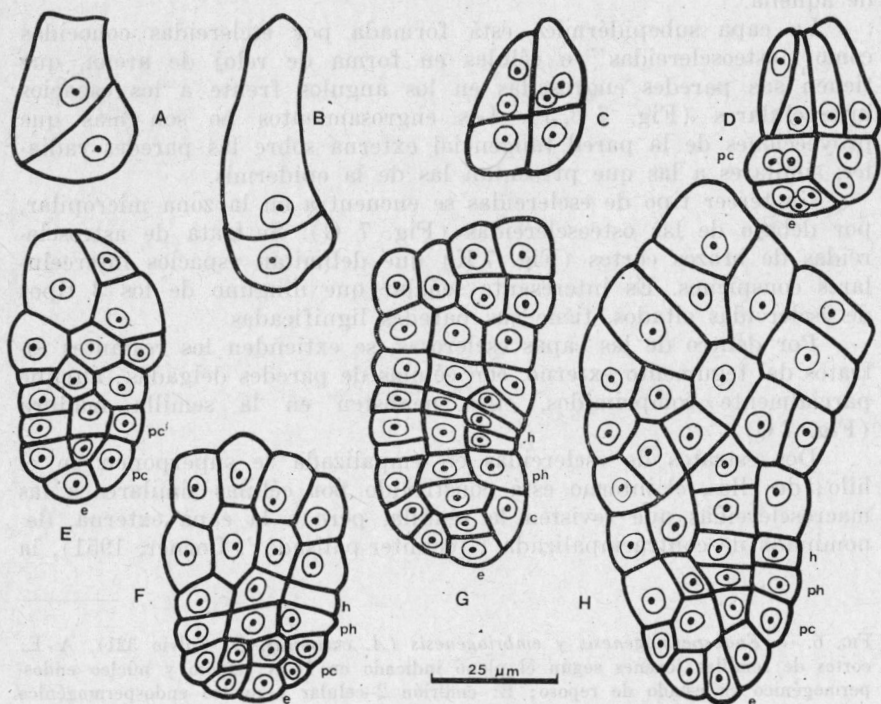


FIG. 5. — Embriogénesis (*A. carinatus*, Di Fulvio 321). A-H: sucesivos estados en el desarrollo del embrión. Abreviaturas: e, epifisis; h, hipófisis; pc, capa generadora de los cotiledones; pc', capa generadora del hipocótilo y de la hipófisis; ph, capa generadora del hipocótilo.

en la zona micropilar, almacenan almidón el cual es consumido durante el desarrollo del embrión.

El episperma deriva sólo del tegumento externo. Su epidermis exterior en empalizada, da lugar a un estrato de macrosclereidas que presentan las paredes irregularmente engrosadas (Fig. 7 C, H), siendo característica la presencia de proyecciones de la pared tangencial externa sobre las paredes radiales. Estas proyecciones determinan una diferencia brusca en la proporción de pared hacia el tercio externo de las células y causan el efecto óptico conocido como "línea lúcida". En la región correspondiente al rafe, el número de estratos de macrosclereidas aumenta, llegando a 3 ó 4 células de espesor; en vista externa esta región tiene forma ovalada y constituye la estructura denominada "lente" (Fig. 7 G). Allí, las macrosclereidas son más angostas y altas que en el resto del tegumento; sin embargo, son más cortas y anchas en estratos más profundos de los márgenes de aquélla.

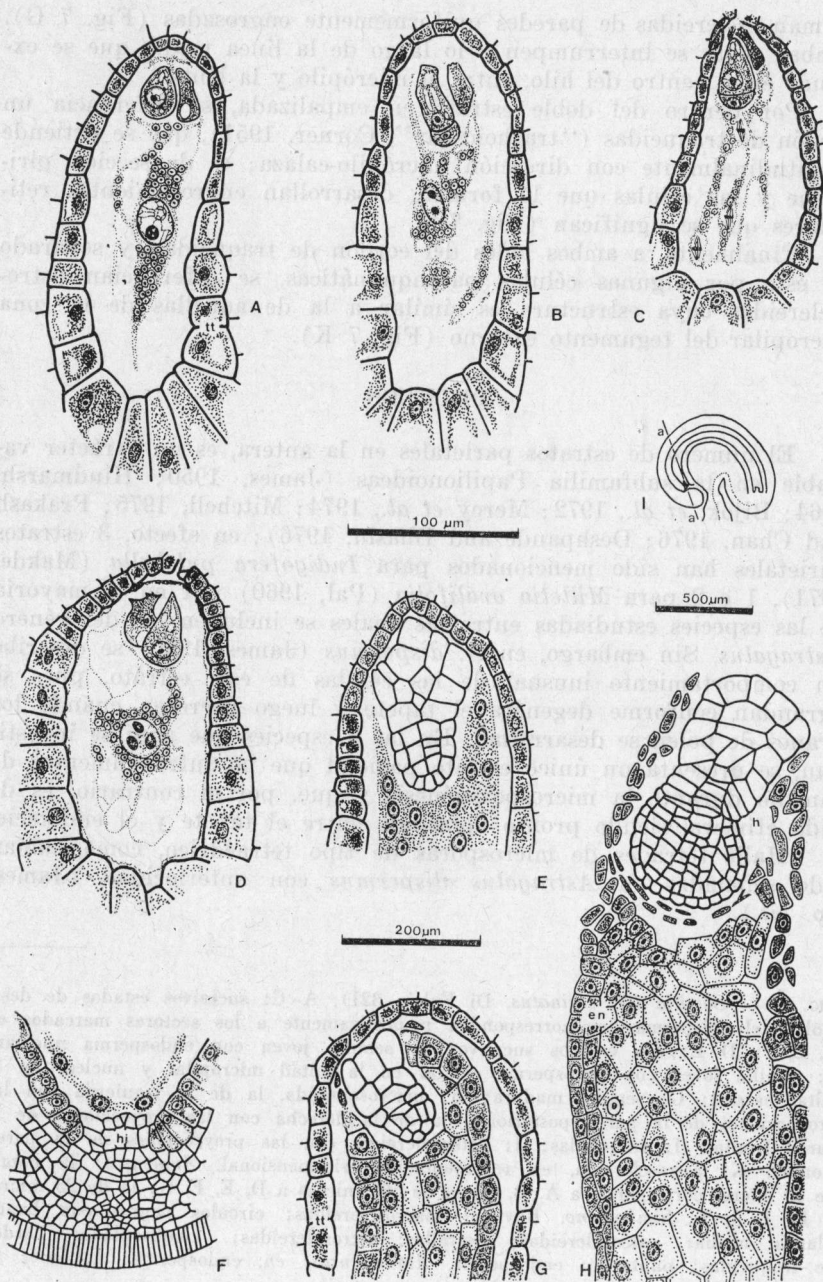
La capa subepidérmica está formada por esclereidas conocidas como "osteosclereidas" o células en forma de reloj de arena, que tienen sus paredes engrosadas en los ángulos frente a los espacios intercelulares (Fig. 7 C, J). Los engrosamientos no son más que proyecciones de la pared tangencial externa sobre las paredes radiales, similares a las que presentan las de la epidermis.

Un tercer tipo de esclereidas se encuentra en la zona micropilar, por debajo de las osteosclereidas (Fig. 7 G). Se trata de astroscle-reidas de brazos cortos (Fig. 7 K) que delimitan espacios intercelulares conspicuos. Es interesante señalar que ninguno de los 3 tipos de esclereidas citados, tiene sus paredes lignificadas.

Por dentro de las capas esclerosas, se extienden los restantes estratos del tegumento externo, con células de paredes delgadas; aunque parcialmente comprimidos, ellos persisten en la semilla madura (Fig. 7 C).

Dos estratos de esclereidas en empalizada se superponen en el hilo; de ellos, el interno está constituido por células similares a las macrosclereidas que revisten la semilla, pero a la capa externa, denominada de contraempalizada ("counter-palisade", Corner, 1951), la

FIG. 6. — *Endospermogénesis y embriogénesis (A. carinatus, Di Fulvio 321)*. A-E: cortes de semillas jóvenes según el plano indicado en I; A: cigoto y núcleo endospermogénico en estado de reposo; B: embrión 2-celular y núcleo endospermogénico aún indiviso, con 2 nucléolos; C: embrión 2-celular y endosperma con varios núcleos en división; D: cigoto y núcleo endospermogénico con 3 nucléolos; E: embrión globular y endosperma nuclear; F: región calazal correspondiente a E; G-H: embrión globular en sucesivos estados, con endosperma celular; I: corte longitudinal por semilla joven. *Aumentos*: la escala de 100 micras corresponde a A, B, C, D, E, G, H; la de 500 micras a I; la de 200 micras a F. *Abreviatura*: h, hipófisis.



forman esclereidas de paredes uniformemente engrosadas (Fig. 7 G). Ambas capas se interrumpen a lo largo de la línea media que se extiende en el centro del hilo, entre el micrópilo y la lente.

Por dentro del doble estrato en empalizada, se diferencia un cordón de traqueidas ("tracheid-bar", Corner, 1951), que se extiende longitudinalmente con dirección micrópilo-calaza; es de sección piri-forme y las células que lo forman, desarrollan engrosamientos reticulares que se lignifican (Fig. 7 I).

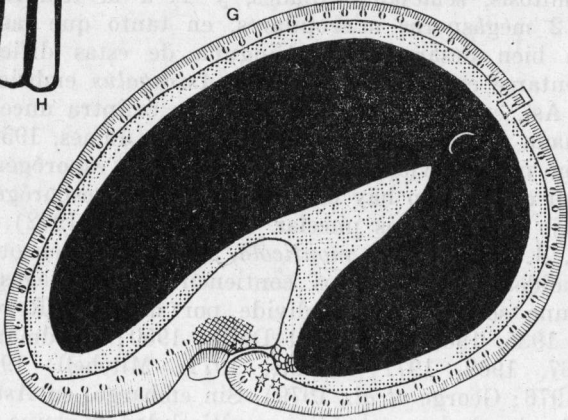
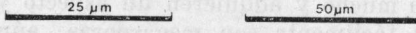
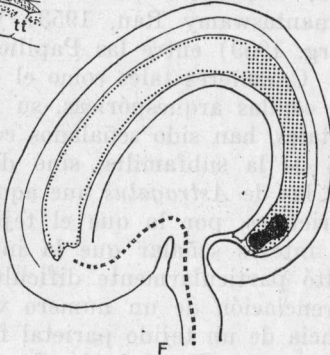
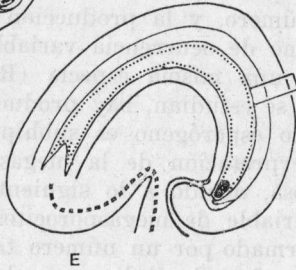
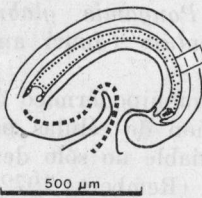
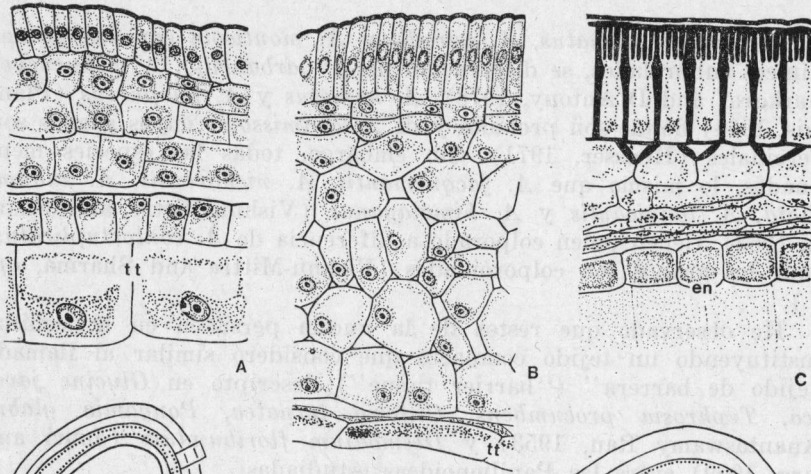
Finalmente, a ambos lados del cordón de traqueidas, y separado de éste por algunas células parenquimáticas, se diferencian astro-esclereidas cuya estructura es similar a la de aquellas de la zona micropilar del tegumento externo (Fig. 7 K).

DISCUSION

El número de estratos parietales en la antera, es un carácter variable en la subfamilia Papilionoideas (James, 1950; Hindmarsh, 1964; Bijok, *et al.*, 1972; Mercy *et al.*, 1974; Mitchell, 1975; Prakash and Chan, 1976; Deshpande and Bhasin, 1976); en efecto, 3 estratos parietales han sido mencionados para *Indigofera pulchella* (Makde, 1971), 1 o 2 para *Milletia ovalifolia* (Pal, 1960) y 1 en la mayoría de las especies estudiadas entre las cuales se incluyen las del género *Astragalus*. Sin embargo, en *A. dispermus* (James, 1950) se describe un comportamiento inusual de las células de este estrato, pues se agrandan conforme degenera el tapete y luego decrecen cuando los granos de polen se desarrollan. En las 3 especies que aquí se investigan, se presenta un único estrato parietal que no sufre aumentos de tamaño durante la microsporogénesis y que, por el contrario, es de vida efímera, siendo pronto aplastado entre el tapete y el endotecio.

Hallé tétrades de microsporas de tipo tetraédrico, como habían sido señaladas en *Astragalus dispermus* con anterioridad (James, *op. cit.*).

FIG. 7. — Semilla (*A. carinatus*, Di Fulvio 321). A-C: sucesivos estados de desarrollo del episperma que corresponden respectivamente a los sectores marcados en D, E, F; D-E: dos estados sucesivos de semilla joven con endosperma nuclear; F: semilla joven con endosperma celular en la mitad micropilar y nuclear en la mitad calazal; G: semilla madura; H: macrosclereida, la de la izquierda con las proyecciones de la pared posterior y la de la derecha con las proyecciones de la pared frontal; I: traqueidas; J: osteosclereida, con las proyecciones de la pared frontal; K: astrosclereida, en representación tridimensional. Aumentos: la escala de 50 micras corresponde a A, B, C; la de 500 micras a D, E, F, G; la de 25 micras a H, I, J, K. Simbolismo. Rayado: macrosclereidas; círculos negros con banda blanca media: osteosclereidas; estrellas: astrosclereidas; cuadrículado: cordón de traqueidas; punteado: endosperma. Abreviaturas: en, endosperma; l, lente; tt, tapete tegumentario.



Astragalus carinatus, *A. parodii* y *A. monticola* con sus granos polínicos subprolados, se diferencian de *A. garbancillo*, *A. pehuénches* (Markgraf and D'Antony, 1978), *A. hamosus* y *A. purpureus* (Plan-chais, 1964) donde son prolados y de *A. chamissonis* cuyos granos son esferoidales (Heusser, 1971). Sin embargo, todas las especies mencionadas, lo mismo que *A. jacquemontii*, *A. nicharensis*, *A. subumbellata*, *A. longicaulis* y *A. himalayanus* (Vishnu-Mittre and Sharma, 1962), tienen polen colporado a diferencia de *A. contortuplicatus*, donde los granos son colporoidados (Vishnu-Mittre and Sharma, *op. cit.*).

He observado que restos de la nucela persisten en la semilla, constituyendo un tejido compacto que considero similar al llamado "tejido de barrera" ("barrier tissue") descrito en *Glucine javanica*, *Tephrosia procumbens*, *Clitoria ternatea*, *Pongamia glabra* (Anantaswamy Rau, 1953) y *Desmodium floribundum* (Johri and Garg, 1959) entre las Papilionoideas estudiadas.

Caracteres tales como el origen hipodérmico o subhipodérmico de las células arqueosporicas, su número, y la producción de células parietales, han sido señalados como de ocurrencia variable no sólo dentro de la subfamilia, sino de una misma especie (Rembert, 1972). En las de *Astragalus* que aquí se estudian, hay producción de células parietales, por lo que el tejido esporógeno es subhipodérmico. Creo de interés señalar que la interpretación de la megasporogénesis resultó particularmente dificultosa, debido a lo siguiente: 1) a la diferenciación de un número variable de megasporocitos, 2) a la presencia de un tejido parietal formado por un número también variable de estratos, 3) al hecho de que 1 a 3 células procedentes del tejido esporógeno, se agrandan mucho y adquieren un aspecto y disposición, que las hace confundir fácilmente con megásporas; aún más, a veces se dividen por mitosis, semejando díades, y 4) a la temprana degeneración de las 2 megásporas micropilares, en tanto que las 2 calazales permanecen bien desarrolladas. Ninguna de estas dificultades pareciera presentarse en otras especies de *Astragalus* embriológicamente conocidas. Así, en *A. dispersmus* existe una caliptra nucelar 2-estratificada, originada a partir de la célula parietal (James, 1950), pero en su formación no intervienen células del tejido esporógeno; en *A. glycyphyllos*, en cambio, no hay caliptra y el tejido esporógeno yace directamente bajo la epidermis nucelar (Bijok *et al.*, 1972).

En *A. carinatus*, *A. parodii* y *A. monticola*, al igual que en otras especies de Papilionoideas cuyos óvulos contienen varios megasporocitos, es siempre uno solo el que se divide por meiosis (Reeves, 1930; Cooper, 1933, 1935, 1938; Paul and Datta, 1950; Hindmarsh, 1964; Rembert, 1967, 1969, 1977; Makde, 1971; Mitchell, 1975; Prakash and Chan, 1976; George *et al.*, 1979). Sin embargo, en *Astragalus glycyphyllos* donde el arqueosporio es multicelular y ocupa to-

talmente la nucela, todas las células arqueospóricas sufren meiosis y varias tétrades de megásporas reemplazan al tejido nucelar en su porción apical (Bijok *et al.*, 1972). Indudablemente, se trataría de un caso único en Papilionoideas que, a mi juicio, sería conveniente reinvestigar.

Rembert (1972), reconoce 12 casos diferentes de megasporogénesis en Leguminosas, asignándoles significado filogenético en las tribus de Papilionoideas. Mis observaciones en *Astragalus* no apoyan las conclusiones de dicho autor ya que, en las 3 especies que estudié, he hallado modelos diferentes de tétrades, aún en óvulos de un mismo ovario. De este modo, las tétrades lineales consideradas por Rembert como primitivas, aparecen en igual proporción con tétrades en T o con tríades lineales, a las cuales considera evolucionadas.

Salvo *Trifolium*, en donde funciona indistintamente la megáspora calazal o la subcalazal (Martin, 1914; Mitchell, 1975), en las restantes Papilionoideas cuya embriología se conoce, la megáspora que funciona es siempre la ubicada en posición calazal; esto último también lo señaló Bijok *et al.* (1972) en *Astragalus glycyphyllos* y James (1950) en *A. dispermus*. Contrariamente, en las especies de *Astragalus* aquí investigadas, ocurre como en *Trifolium*.

Los estudios de saco embrionario realizados en Papilionoideas revelan, en general, un desarrollo monospórico (Tipo *Polygonum*). Sin embargo, sacos embrionarios bispóricos (Tipo *Allium*) han sido indicados por Rembert (1972) para *Pueraria* (Faseoleas), *Lupinus* y *Laburnum* (Genisteas) y ambos tipos combinados en *Lathyrus* (Vicieas) y *Wisteria* (Galegueas). Al igual que en *Astragalus glycyphyllos* (Bijok *et al.*, *op. cit.*) y *A. dispermus* (James, 1950), el saco embrionario es monospórico en *A. carinatus*, *A. parodii* y *A. monticola*.

Bocquet y Bersier (1959) en su estudio sobre la morfología de los óvulos de las Leguminosas, indican que el de *Astragalus* pertenece al tipo ana-anfítropo, pero nada aluden a la composición histológica del cuerpo basal. Según mis observaciones, éste se origina a partir de tejidos que pertenecen tanto a la porción funicular como tegumentaria del rafe.

Nada se conocía en el género acerca del origen de los tegumentos en el óvulo, habiéndose señalado en la subfamilia, un origen subdermal para el tegumento externo (Bouman, 1974). Este estudio pone en evidencia el origen exclusivamente dermal tanto del tegumento interno como del externo, carácter este último que Bouman (*op. cit.*) considera evolucionado.

La penetración del tubo polínico a través de una sinérgida y la consecuente destrucción de ésta luego de la fecundación, se había señalado en *Astragalus glycyphyllos* (Bijok *et al.*, 1972), *Milletia ovalifolia* (Pal, 1960), *Glycyne max* (Prakash and Chan, 1976) y

Zornia diphylla (Deshpande and Bhasin, 1976), todas ellas Papilionoideas; sin embargo, en ninguno de estos trabajos hay figuras que ilustren dicha referencia.

Por su parte Cooper (1933, 1935) en *Melilotus* y *Medicago*, Deshpande and Untawale (1971) en *Indigofera enneaphylla* y Bijok *et al.* (*op. cit.*) en un pequeño porcentaje de sacos de *Astragalus glycyphyllos*, señalan que la descarga del tubo polínico se produce entre las sinérgidas y la oosfera y, por lo tanto, las mismas no son destruidas durante la fecundación. Aunque el proceso no se describe en *Indigofera pulchella*, Makde (1971) representa el tubo polínico descargando en la célula media, sin penetrar a través de ninguna de las 2 sinérgidas. En *Phaseolus vulgaris* (Wenstein, 1926), en *Arachis hypogaea* (Smith, 1956) y en *Wisteria sinensis* (Rembert, 1967), se dice que las sinérgidas ya no están presentes en el momento de la fecundación. Finalmente, en *Astragalus dispermus* (James, 1950), se afirma que la fecundación ocurre también sin dañar a las sinérgidas.

Por otra parte, el aparato filar característico de dichas células, ha sido descrito en pocas especies. En la mayoría de los trabajos, no hay referencias sobre el mismo, e incluso se indica su ausencia en *Crotalaria juncea* (Samal, 1936), *Crotalaria intermedia* (Paul and Datta, 1950), *Arachis hypogaea* (Smith, 1956) y en *Glycyne max* y *Phaseolus vulgaris* (George *et al.*, 1979). En las 3 especies de *Astragalus* que aquí estudio, las sinérgidas presentan un aparato filar bien desarrollado. Sin embargo, dado el hecho de que nunca vi tubos polínicos descargando en ellas y, por el contrario, a veces las hallé intactas en sacos donde el endosperma y el embrión se encontraban en desarrollo, es probable que la fecundación ocurra, como en otros casos antes mencionados, sin dañar a las sinérgidas. Para dilucidar este problema será necesario un estudio especial.

El embrión de las especies de *Astragalus* que aquí se analizan, tiene un desarrollo similar al descrito por Crété (1951) para *A. glycyphyllos*; como en dicha especie, la hipófisis deriva de la célula basal algunas veces, y otras, de la célula apical aún en óvulos de un mismo ovario.

La endospermogénesis sigue las líneas generales establecidas para Papilionoideas (Anantaswamy Rau, 1951, 1953; Johri and Garg, 1959). Se trata, por lo tanto, de un endosperma de tipo nuclear en el que la formación de paredes es centrípeta y se inicia en el extremo micropilar; no hay citocinesis en la mitad calazal y, en este aspecto, las especies que estudié se diferencian de *A. glycyphyllos* (Bijok *et al.*, 1972) y de *A. dispermus* (James, 1950); donde la formación de paredes ocurre en todo el endosperma.

En cuanto a la estructura y desarrollo de la semilla, *A. carinatus*, *A. parodii* y *A. monticola*, no se apartan de lo ya señalado por diferentes autores para la subfamilia (Pitot, 1935; Corner, 1951; Kopoo-

shian and Isely, 1966). Se diferencia un tapete tegumentario o endotelio a partir de la epidermis interna del tegumento interno, como ha sido referido en otros géneros (Young, 1905; Cooper, 1933; Anantaswamy Rau, 1951, 1953; Deshpande and Untawale, 1971). Posee un único hacecillo vascular ubicado en el rafe, coincidiendo, entre las Galegueas, con *Indigofera enneaphylla* y diferenciándose de *Tephrosia candida* donde hay, además, hacecillos recurrentes (Corner, 1951). En las especies estudiadas no se desarrolla arilo, estructura de origen funicular que Pitot (*op. cit.*) y Corner (1951) consideran típica de las semillas de Papilionoideas; sin embargo, Patel (1976) también halló especies sin arilo, dentro de la subfamilia.

Las particularidades del endosperma en las semillas maduras, coinciden con las señaladas ya para *Astragalus* y otros géneros de Leguminosas (McClendon *et al.*, 1976; Meier and Grant Reid, 1977). Se reconoce, por lo tanto, una capa periférica de células con aleurona y, hacia el interior, una masa mucilaginosa que estaría compuesta casi exclusivamente de galactomananos depositados en las paredes, de tal modo que el lumen celular queda ocluido (McClendon *et al.*, *op. cit.*).

CONCLUSIONES

A. Conclusiones morfológicas.

1. *Microsporangio*. La pared de la antera, cuando joven, está constituida por 4 estratos celulares: epidermis, endotecio, un estrato parietal y tapete. Al madurar, el endotecio forma bandas engrosadas en las paredes radiales que se unen en la pared tangencial interna; el estrato parietal y el tapete secretor son consumidos.

2. *Microsporogénesis y polen*. Hay formación simultánea de tétrades tetraédricas. Granos de polen subprolados, 3-colporados, con poros alargados y exina reticulada. Membrana apertural lisa en *A. monticola* y verrugosa en *A. carinatus* y *A. parodii*.

3. *Óvulo, megasporogénesis y megagametófito*. Óvulo campilótropo en antesis y anfítropo al desarrollarse la semilla, 2-tegumentado y crasinucelado. Tegumentos de origen dermal. Caliptra nucelar con 2 o 3 estratos celulares, a veces contribuye a su formación el tejido esporógeno. Cuerpo basal originado del rafe. Tejido esporógeno multicelular, megasporocitos diferenciados en número variable, pero en sólo 1 ocurre meiosis. Tétrades de megásporas, lineal o en T. Saco embrionario monosporico tipo *Polygonum*, originado indistintamente de la megáspora calazal o subcalazal.

4. *Fecundación*. Es porogámica y se produce sin dañar las sinérgidas. Los tubos polínicos forman frecuentes tapones de calosa en su descenso por el estilo.

5. *Embriogénesis y endospermogénesis*. Las segmentaciones de la célula apical coinciden con lo descrito en *Trifolium minus* por Souèges. La hipófisis puede ser originada indistintamente por la célula basal o apical. El endosperma es de tipo nuclear y forma paredes sólo en la mitad micropilar.

6. *Semilla*. Un endotelio o tapete tegumentario se reconoce en las primeras etapas del desarrollo de la semilla. El episperma deriva sólo del tegumento externo y sus particularidades, al igual que las del hilo y las de la región subhilar, coinciden con las señaladas por Corner para semillas de Papilionoideas; como características diferenciales, *Astragalus* carece de arilo funicular y de hacecillos recurrentes. El endosperma persiste en la semilla madura y su aspecto es el de una masa mucilaginosa cubierta por una capa de células que acumulan proteínas.

B. Conclusiones taxonómicas.

Si bien es prematuro obtener conclusiones generales de esta índole, dado el escaso número de especies estudiadas, mis observaciones indican que:

7. Dentro del género *Astragalus*, las secciones *Astragalus* y *Phaca* muestran caracteres embriológicos y palinológicos similares. La única diferencia encontrada, que creo puede tener valor taxonómico, se refiere a las características de la membrana apertural de los granos de polen, la cual es lisa en *A. monticola* (sección *Phaca*) y verrugosa en *A. carinatus* y *A. parodii* (sección *Astragalus*).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Cátedra de Morfología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba y contó con el apoyo de un subsidio de la Secretaría de Ciencia y Tecnología. Fue dirigido por la Dra. T. Emil Di Fulvio, habiendo colaborado el Ing. Agr. Armando T. Hunziker en la búsqueda y determinación de los materiales y el Dr. Alfredo E. Cocucci en la discusión de algunos problemas embriológicos. A las instituciones y profesores mencionados, deseo expresar mi profundo reconocimiento. Agradezco también, al personal técnico del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la obtención y procesamiento de las fotomicrografías referentes al polen.

BIBLIOGRAFIA

- ANANTASWAMY RAU, M. 1951. The endosperm in some of the *Papilionaceae*. *Phytomorphology* 1 (3-4): 153-158, f. 1-18.
- 1953. Some observations on the endosperm in *Papilionaceae*. *Phytomorphology* 3 (3): 209-222, f. 1-61.
- BARNEBY, T. C. 1964. Atlas of North American *Astragalus*. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 13 (1-2): I-III, 1-1188.
- BIJOK, K., E. ADAMKIWICZ and Z. GORAL. 1972. Cyto-embryological studies on *Astragalus glycyphyllos* L. from the areas of northern and central Poland. *Acta Soc. Bot. Polon.* 41 (4): 463-480, f. 1-37.
- BOCQUET, G. et J. D. BERSIER. 1959. Les formes d'ovules chez les Légumineuses. *Actes Soc. Helv. Sci. Nat. Lausanne* 59: 158-159.
- BOUMAN, F. 1974. *Developmental studies of the ovule, integuments and seed in some Angiosperms*, 1-180, f. 1-107. Amsterdam.
- BURKART, A. 1952. *Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas*. 2da. ed., I-XI, 1-569, f. 1-130, láms. I-XXIII. Buenos Aires.
- BUSS, P. A. Jr. and N. R. LERSTEN. 1975. Survey of tapetal nuclear number as a taxonomic character in *Leguminosae*. *Bot. Gaz.* 136 (4): 388-395, f. 1-27.
- COOPER, D. C. 1933. Macrosporogenesis and embryology of *Melilotus*. *Bot. Gaz.* 95: 143-155, f. 1-53.
- 1935. Macrosporogenesis and embryology of *Medicago*. *Jour. Agr. Res.* 51: 471-477, pl. 1-3.
- 1938. Cytological investigations of *Pisum sativum*. *Bot. Gaz.* 99: 584-591, f. 1-28.
- CORNER, E. J. H. 1951. The Leguminous seed. *Phytomorphology* 1 (1-2): 117-150, f. 1-29.
- CRÉTÉ, P. 1951. Embryologie végétale. Embryogénie des Papilionacées. Développement de l'embryon chez l'*Astragalus glycyphyllos* L. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 232: 1009-1011, f. 1-35.
- DAVIS, G. L. 1966. *Systematic embryology of the Angiosperms*, I-VIII, 1-528. New York.
- DESHPANDE, P. K. and R. K. BHASIN. 1976. A contribution to the life history of *Zornia diphylla* Pers. *Jour. Indian Bot. Soc.* 55: 115-124, f. 1-53.
- DESHPANDE, P. K. and A. G. UNTAWALE. 1971. Development of seed and fruit in *Indigofera enneaphylla* L. *Bot. Gaz.* 132 (2): 96-102, f. 1-35.
- ERDTMAN, G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy*. *Angiosperms*, I-XII, 1-539, f. 1-261. Stockholm.
- 1969. *Handbook of Palynology*, 1-486, f. 1-50, plates 1-125. Munksgaard.
- FAEGRI, K. and J. IVERSEN. 1964. *Textbook of pollen analysis*, 1-237, f. 1-23, tab. 1-8, pl. I-VIII (Traducción de la 2da. ed. danesa, 1964). New York.
- GEORGE, G. P., R. A. GEORGE and J. M. HERR, Jr. 1979. A comparative study of ovule and megagametophyte development in field-grown and greenhouse-grown plants of *Glycine max* and *Phaseolus aureus* (*apilionaceae*). *Am. Jour. Bot.* 66: 1033-1043, f. 1-48.
- HEUSSER, C. J. 1971. *Pollen and spores of Chile*, I-XIII, 1-167, pl. 1-60. Arizona.
- HINDMARSH, C. J. 1964. Gametophyte development in *Trifolium pratense* L. *Austral. Jour. Bot.* 12: 1-14, f. 1-83.
- JAMES, L. E. 1950. Studies in the vascular and developmental anatomy of the subgenus *Hesperastragalus*. *Am. Jour. Bot.* 37: 373-378, f. 1-49.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*, I-XI, 1-523, f. 1-110. New York.
- JOHRI, B. M. and S. GARG. 1959. Development of endosperm haustoria in some *Leguminosae*. *Phytomorphology* 9 (1): 34-46, f. 1-91.

- KOPOOSHIAN, H. and D. ISELY. 1966. Seed character relationships in the *Leguminosae*. *Iowa Acad. Sci.* 73: 59-67, f. 1-5.
- MAKDE, K. H. 1971. Gametophytes and fertilization of *Indigofera pulchella* Roxb. *Jour. Indian Bot. Soc.* 50: 308-311, f. 1-18.
- MARKGRAF, V. and H. L. D'ANTONY. 1978. *Pollen flora of Argentine. Modern spore and pollen types of Pteridophyta, Gymnospermae and Angiospermae*, I-XI, 1-202, pl. 1-43. Arizona.
- MARTIN, J. N. 1914. Comparative morphology of some *Leguminosae*. *Bot. Gaz.* 58: 154-167, f. 1-53.
- MCCLENDON, J. H., W. G. NOLAN and H. F. WENZLER. 1976. The role of the endosperm in the germination of legumes: galactomannan, nitrogen and phosphorus changes in the germination of guar (*Cyamopsis tetragonoloba*; *Leguminosae*). *Am. Jour. Bot.* 63 (6): 790-797, f. 1-10.
- MEIER, H. and J. S. GRANT REID. 1977. Morphological aspects of the galactomannan formation in the endosperm of *Trigonella foenum-graecum* L. (*Leguminosae*). *Planta* 133: 243-248, f. 1-8.
- MERCY, S. T., S. N. KAKAR and T. M. VARGHESE. 1974. Embryology of *Cicer arietinum* and *C. soongaricum*. *Bull. Torrey Club* 101 (1): 26-30, f. 1-30.
- MITCHELL, J. P. 1975. Megasporogenesis and microsporogenesis in *Vicia faba*. *Canad. Jour. Bot.* 53: 2804-2812, f. 1-32.
- PAL, N. 1960. Development of the seed of *Milletia ovalifolia*. *Bot. Gaz.* 122: 130-137, f. 1-48.
- PATEL, J. D. 1976. Comparative seed coat anatomy of some indian edible pulses. *Phyton* (Austria) 17 (3-4): 287-299, f. 1-44.
- PAUL, A. K. and R. M. DATTA. 1950. Structure and development of the female gametophyte in *Crotalaria intermedia* Kotschy. *Philip. Jour. Sci.* 79: 59-65, f. 1-8.
- PITOT, A. 1935. Le développement du tégument des graines de Légumineuses. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 82: 311-314, f. 1-2.
- PLANCHAIS, N. 1964. Le pollen de quelques Papilionacées méditerranéennes et sub-méditerranéennes. *Pollen et Spores* 6 (2): 515-526, f. 1-17.
- PRAKASH, N. and Y. Y. CHAN. 1976. Embryology of *Glycine max*. *Phytomorphology* 26: 302-309, f. 1-3.
- REEVES, R. F. 1930. Development of the ovule and embryo sac of alfalfa. *Am. Jour. Bot.* 17: 239-246, f. 1-20.
- REMBERT, D. H. Jr. 1967. Development of the ovule and megagametophyte in *Wisteria sinensis*. *Bot. Gaz.* 128 (3-4): 223-229, f. 1-23.
- 1969. Comparative megasporogenesis in *Papilionaceae*. *Am. Jour. Bot.* 56 (5): 584-591, f. 1-66.
- 1972. Phylogenetic significance of megaspore tetrad pattern in Leguminales. *Phytomorphology* 21 (1): 1-9, f. 1-2.
- 1977. Ovule ontogeny, megasporogenesis, and early gametogenesis in *Trifolium repens* (*Papilionaceae*). *Am. Jour. Bot.* 64 (4): 483-488, f. 1-4.
- SAMAL, K. K. 1936. The development of the embryo sac and embryo in *Crotalaria juncea* L. *Jour. Indian Bot. Soc.* 15: 19-31.
- SMITH, B. W. 1956. *Arachis hypogaea*. Normal megasporogenesis and syngamy with occasional single fertilization. *Am. Jour. Bot.* 43 (2): 81-89, f. 1-36.
- SOUEGES, M. R. 1929. Recherches sur l'embryogénie des Légumineuses. *Trifolium minus* Rehl. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 76: 338-346, f. 45-78.
- TAUBERT, J. 1894. *Leguminosae*. En Engler, A. und K. Prantl. *Die natürlichen Pflanzenfamilien* 3 (3): 70-387. Leipzig.
- VISHNU-MITRE and B. D. SHARMA. 1962. Studies of indian pollen grains. 1. *Leguminosae*. *Pollen et Spores* 4 (1): 5-45, pl. 1-V.

- WENSTEIN, A. I. 1926. Cytological studies on *Phaseolus vulgaris*. *Am. Jour. Bot.* 13: 248-263, pl. I-XIX.
- WILLIAM, M. C. and R. C. BARNEBY. 1977. The occurrence of nitro-toxins in north american *Astragalus* (*Fabaceae*). *Brittonia* 29: 310-326.
- YOUNG, W. J. 1905. The embryology of *Melilotus alba*. *Proc. Indiana Acad.* 15: 133-141, f. 1-50.