

00381

29
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ASIMETRIA REPRODUCTIVA ENTRE LOS MORFOS FLORALES DE
Erythroxylum havanense JACQ. (ERYTHROXYLACEAE):
UN ENFOQUE EMBRIOLOGICO Y ANATOMICO**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A
M. EN C. SONIA VAZQUEZ SANTANA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco infinitamente a la Dra. Judith Márquez Guzmán, el constante apoyo durante la dirección de esta tesis y manifiesto mi admiración a su gran calidad académica y humana, que ha estimulado la formación de muchos estudiantes, y por la fortuna de interactuar con ella. Mi respetable agradecimiento a los otros integrantes del Comité Tutorial: Dr. César A. Domínguez P. T. y Dr. E. Mark Engleman por todas las ideas y sugerencias a la presente investigación.

Deseo también agradecer a los otros cuatro miembros del jurado: Dr. Sergio Cevallos F., Dr. Guillermo Laguna H., Dr. Luis Felipe Jiménez G. y Dr. Víctor Manuel Chávez A., por su cuidadosa revisión al manuscrito y sus acertadas sugerencias.

Así mismo, agradezco al M. en C. Alejandro Martínez Mena y al Biól. Alfredo Gamboa por su valiosa colaboración en el trabajo fotográfico que ilustra esta tesis.

Por otra parte, agradezco a la Biól. Yolanda Hornelas y a la Biól. Ana Rivas por las fotografías del microscopio electrónico de barrido.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento al personal de la Estación de Biología Chamela, del Instituto de Biología de la UNAM, especialmente a Felipe Noguera y Ricardo Ayala.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Citología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán. El apoyo económico fue obtenido del presupuesto del Lab. de Citología, de una beca de estudios otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y por el Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado.

**Con todo mi cariño para mis papás: Guillermo y Noemí
y para todos mis hermanos: Clarita, Rogelio, Julián, Guillermo,
Manuel, Samia, Rosalía y Edgar.**

**Con profunda admiración y amor a Felipe: por su interés, por su paciencia
y su ayuda en tantos momentos
de nuestra vida.**

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Citología: ¡MIL GRACIAS!

CONTENIDO

Contenido	i
Lista de tablas y figuras	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
El desarrollo del óvulo	6
El desarrollo del polen	7
La microsporogénesis	7
La microgametogénesis	7
El tapete	10
Procesos involucrados en la esterilidad masculina	11
II. OBJETIVOS	13
III. MATERIAL Y MÉTODOS	14
Sitio de estudio	14
Especie estudiada	16
Recolección del material	17
Procesamiento del material	19
IV. RESULTADOS	22
La aparición de los verticilos florales	22
La organización del meristemo floral	22
El desarrollo de la antera	23
La microsporogénesis	23
La microgametogénesis	23
El desarrollo de la pared de la antera	24
El desarrollo del gineceo	24
El desarrollo del óvulo	24
La megagametogénesis	26
El desarrollo de la semilla	26

La embriogénesis	27
La endospermogénesis	27
El desarrollo del fruto	27
Las diferencias durante el desarrollo de las anteras entre los morfos pin y thrum	29
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	57
VII. LITERATURA CONSULTADA	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los sistemas sexuales actuales de las angiospermas	2
Tabla 2. Características florales de <i>Erythroxylum havanense</i>	17

LISTA DE FIGURAS

Fig. A. Las cruces legítimas e ilegítimas en plantas distílicas	3
Fig. B. El desarrollo del óvulo	4
Fig. C. La microsporogénesis y la microgametogénesis en las angiospermas	8
Fig. D. Las paredes celulares de un grano de polen maduro	9
Fig. E. Mapa de localización de la Estación de Biología Chamela	15
Fig. F. El desarrollo del óvulo de <i>E. havanense</i>	25
Figs. 1-6. Lámina 1. La morfología de los botones florales	32
Figs. 7-14. Lámina 2. La meiosis de las células madres del polen	34
Figs. 15-22. Lámina 3. El desarrollo y la morfología de los granos de polen	36
Figs. 23-30. Lámina 4. El desarrollo de pared de la antera y de los primordios carpelares	38
Figs. 31-38. Lámina 5. El desarrollo del óvulo	40
Figs. 39-47. Lámina 6. El desarrollo del fruto y de la semilla	42
Figs. 48-56. Lámina 7. La embriogénesis, la endospermogénesis y las anteras abortivas	44
Figs. 57-66. Lámina 8. Anormalidades en el androceo del morfo thrum	46

RESUMEN

Erythroxylum havanense Jacq. es un arbusto distílico y autoincompatible, que presenta dos morfos florales: pin (flor con estilos largos y estambres cortos) y thrum (con estilos cortos y estambres largos). Sólo se producen semillas en aquellas polinizaciones donde el polen de uno de los morfos llega a los estigmas del morfo contrario (cruzas legítimas). Los resultados obtenidos a partir de estudios ecológicos, sugieren que posiblemente, es una especie en transición evolutiva hacia otro sistema reproductor. La hipótesis de esta investigación plantea que la asimetría reproductora observada entre los morfos pin y thrum de *E. havanense*, puede verse reflejada en el desarrollo de sus estructuras reproductoras puesto que se sabe, que el morfo thrum produce un mayor número de semillas en comparación con el morfo pin, quien presenta mayor número de granos de polen viables y mayor tasa de crecimiento de los tubos polínicos.

Se realizó un estudio detallado y comparativo del desarrollo de las estructuras reproductoras de los morfos pin y thrum de *Erythroxylum havanense*: el desarrollo de las anteras, los granos de polen, los óvulos y las semillas.

Se encontraron evidencias de que las plantas thrum presentan un alto número de anomalías en el desarrollo del androceo, por lo tanto es un estéril masculino parcial. El morfo pin desarrolla mejor la función masculina, porque no presenta anomalías en el desarrollo del androceo y por lo tanto el número de los granos de polen maduros y aptos para la fecundación, es mucho mayor que en el morfo thrum. En este morfo también se forman semillas, aunque en menor número que en las thrum.

En conclusión, se propone que el sistema heterostílico de la población estudiada de *E. havanense* se funciona como un sistema reproductor parcialmente ginodioico, donde el morfo thrum se comporta como un morfo femenino (y parcialmente estéril masculino) y el morfo pin como bisexual. Este es un primer reporte donde un sistema heterostílico se comporta como ginodioico parcial a través de la esterilidad masculina.

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los sistemas reproductores en las angiospermas presentan una gran diversidad de expresión (Bawa y Beach, 1981; Dafni, 1992 y Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993; Tabla 1) y en general se acepta que son el resultado de un proceso de evolución por selección natural (Willson, 1990).

La heterostilia es un sistema reproductor caracterizado por presentar individuos con dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales, que difieren en la longitud de los estilos y los estambres de las flores (Vuilleumier, 1967; Barrett, 1990). En especies con sistemas distílicos, se presentan individuos con flores de estilos largos y estambres cortos (flores *pin*) e individuos con flores de estilos cortos y estambres largos (flores *thrum*). Solamente se producen frutos cuando las cruza ocurren entre morfos diferentes (*cruzas legítimas*), y raramente en cruza entre los mismos morfos (*cruzas ilegítimas*) (Fig. A).

La heterostilia está asociada con la incompatibilidad que previene la autofecundación y la cruce entre morfos iguales (Vuilleumier, 1967; Ganders, 1979b; Barrett, 1990). El nivel de compatibilidad dentro del mismo morfo varía entre poblaciones y entre especies (Sobrevilla *et al.*, 1983; Wyatt, 1983; Barrett *et al.*, 1989).

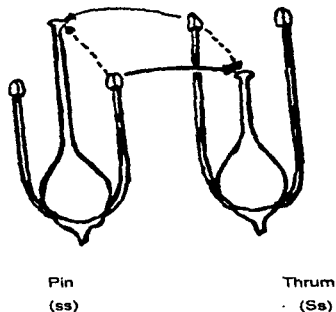
La heterostilia (distilia) es un sistema reproductor gobernado por un solo gen (factor) con dos alelos: *S* y *s*, uno de los cuales es un dominante simple (Bateson y Gregory, 1905, citados en Lewis y Jones, 1992). Las plantas *pin* presentan el genotipo *ss* y las *thrum* *Ss* (Fig. A). La excepción de esto se presenta en las especies heterostílicas de las Plumbaginaceae, donde las *pin* son las heterocigóticas y las *thrum* las homocigóticas (Baker, 1966).

Cuando se presenta un genotipo *SS*, el cual es muy raro en la naturaleza, es fenotípicamente un *thrum* y se presenta cuando hay compatibilidad intramorfos (Vuilleumier, 1967). En las cruza *Ss* x *ss* (cruza legítimas) la descendencia resultante presenta aproximadamente igual número de individuos *pin* y *thrum* ya que el gen de la distilia segrega mendelianamente (Ganders, 1979a; Shivanna y Johri, 1985; Lloyd y Webb, 1992b).

TABLA 1. Clasificación de los sistemas sexuales de las angiospermas (Beava y Beach, 1981, modificado por Dafni, 1992 y Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993).

1. *Distribución espacial de los órganos reproductores masculinos y femeninos*
 - 1.1. *Plantas individuales*
 - Hermafrodita*: plantas individuales con sólo flores bisexuales.
 - Monoico*: plantas individuales con flores unisexuales pistiladas y estaminadas.
 - Andromonoico*: plantas con flores bisexuales y estaminadas.
 - Ginomoico*: plantas con flores bisexuales y pistiladas.
 - Poligomomoico*: planta con flores bisexuales, estaminadas y pistiladas.
 - 1.2. *Grupo de plantas*
 - Diico*: plantas con flores pistiladas o estaminadas.
 - Androdiico*: plantas con flores bisexuales o estaminadas.
 - Ginodiico*: plantas con flores bisexuales o pistiladas.
 - Poligomodiico* (trioico): plantas con flores bisexuales, estaminadas o pistiladas.
2. *Aislamiento temporal o espacial de los órganos masculinos y femeninos dentro de una flor hermafrodita o la coexistencia de flores unisexuales sobre una planta (especies monoicas)*
 - 2.1. *Protándrico*: liberación del polen antes de que los estigmas estén receptivos.
 - 2.2. *Protógino*: los estigmas son receptivos antes de que el polen se libere de las anteras.
 - 2.3. *Hercogamia*: los órganos masculinos y femeninos maduran simultáneamente, pero están espacialmente separados.
3. *Alelos de autoincompatibilidad bioquímica (reconocimiento-rochazo)*
 - 3.1. *Autoincompatibilidad*: plantas polimórficas con respecto a la presencia de alelos de autoincompatibilidad. En las polinizaciones se comparten los alelos de autoincompatibilidad, las autopolinizaciones no forman frutos.
 - 3.2. *Autocompatibilidad*: todas las polinizaciones forman frutos, incluso las autopolinizaciones.
4. *Variación en la longitud de los estilos y los estambres o dimorfismos de los estilos (²) autoincompatibilidad*
 - 4.1. *Heterostilia*
 - Distilia*: los individuos tienen flores con estilos largos y estambres cortos (pin) o flores con estilos cortos y estambres largos (thrum).
 - Tristilia*: los individuos tienen flores con estilos cortos, medianos o largos en relación con la longitud de los estambres.
 - 4.2. *Enantiomorfia* (= Enantioestilia): individuos con flores con desviación del estilo hacia la izquierda o derecha del eje floral.

Fig. A. Las cruzas legítimas (líneas continuas) e ilegítimas (líneas punteadas) en plantas distílicas. Las letras en paréntesis representan el genotipo de los morfos.



La heterostilia es uno de los sistemas que puede dar origen a otro sistema reproductor, especialmente al dioicismo (Ornduff, 1966; Ganders, 1979b). Las plantas heterostílicas son un sistema ideal para evaluar hipótesis evolutivas, ya que se conoce la genética del dimorfismo sexual y su relación con el sistema de incompatibilidad; generándose algunas hipótesis sobre su estabilidad evolutiva (Ganders, 1979b; Barrett *et al.*, 1989). En teoría, para que un sistema heterostílico sea evolutivamente estable, es necesario que ambos morfos tengan la misma adecuación, una situación muy común en este tipo de especies. En aquellas especies heterostílicas que se encuentran en transición evolutiva hacia otro sistema reproductor, hay una especialización en las funciones sexuales de los morfos, mostrando diferencias perceptibles en su funcionamiento masculino o femenino, mayor producción de polen viable o mayor número de semillas respectivamente (Wyatt, 1983).

Domínguez (1990) y Ávila (1991) propusieron la hipótesis de que el sistema heterostilico (distilico) de *Erythroxylum havanense*, podría encontrarse en posible transición evolutiva hacia el dioicismo ya que presenta una asimetría en la fecundidad de los morfos, que se manifiesta en una alta producción de semillas en el morfo thrum, la cual es casi dos veces mayor que la producida por el morfo pin. Además la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos *in vitro* en el morfo pin, es mayor que la del morfo thrum. Este tipo de asimetría reproductora no se debe a los polinizadores ni al flujo de polen asimétrico, tal como se ha descrito para otros sistemas donde la heterostilia ha evolucionado hacia sistemas dioicos (Ornduff, 1966; Lloyd, 1979; Barrett, 1980; Beach y Bawa, 1980).

Existen géneros con especies dioicas y distilicas, proponiéndose la distilia como ancestro (Muenchow y Grebus, 1989). Estos géneros son: *Mussaenda*, Rubiaceae (Baker, 1986, citado en Muenchow y Grebus, 1989), *Psychotria*, Rubiaceae (Vuilleumier, 1967), *Coussarea*, Rubiaceae (Beach y Bawa, 1980), *Nymphoides*, Menyanthaceae (Ornduff, 1966), *Cordia*, Boraginaceae (Opler *et al.*, 1975) y *Erythroxylum*, Erythroxylaceae (Schulz, 1931; Ganders, 1979a). En casi todos los casos las plantas thrum se convierten en masculinas y las pin en femeninas (Ganders, 1979b; Beach y Bawa, 1980; Wyatt, 1983), raramente ocurre que un thrum se convierta en flor pistilada y un pin en flor estaminada (Barrett, 1980).

Estos antecedentes fueron la base de la presente investigación, la cual consistió en el estudio de la ontogenia de los órganos sexuales en los morfos pin y thrum de *E. havanense*, con el propósito de encontrar en el estudio embriológico de esta especie, una explicación a la asimetría reproductora observada.

La embriología es una rama de la Botánica que estudia el desarrollo de las estructuras reproductoras en las plantas (Maheshwari, 1950; Bhandari, 1984; Shivanna y Johri, 1985). La diferenciación del meristemo floral, la formación de los órganos masculinos y femeninos de la planta, la formación de los gametofitos, la fecundación y el desarrollo de la semilla, son procesos estudiados por la embriología de las angiospermas (Davis, 1966).

La aplicación de la embriología en el conocimiento de los sistemas heterostílicos, debe de incluir estudios comparativos entre los morfos, con el propósito de detectar, si los hubiera, alteraciones durante el desarrollo normal, que pudieran repercutir en la fecundidad de los individuos.

En la literatura consultada, los trabajos embriológicos no comparan ambos morfos en los sistemas distílicos. Existen estudios morfológicos de los caracteres asociados con el síndrome heterostílico como: A) la longitud recíproca entre los estilos y los estambres; B) el tamaño y la forma, y algunas veces hasta el color de la superficie estigmática; C) la diferencia en el tamaño del polen, generalmente los granos de polen del morfo thrum son más grandes que los del morfo pin y en algunas especies se han encontrado diferencias entre cada uno de los verticilos de los estambres presentes en cada morfo; D) diferencias en el número de granos de polen, siendo mayor la cantidad en el morfo pin y E) la escultura de la exina, el color del polen y el tipo y la cantidad de reservas dentro de los granos de polen también pueden variar entre los morfos florales (Rogers, 1979; Baker y Baker, 1979; Ganders, 1979a, 1979b; Dulberger, 1992; Richards y Barrett, 1992).

En los trabajos embriológicos sobre el género *Erythroxylum*, se describen procesos aislados como el desarrollo de las anteras, el desarrollo de los óvulos y el desarrollo de las semillas (Narayana, 1960, 1964, 1970; Corner, 1976; Boesewinkel y Geenen, 1980).

Solo existe un trabajo embriológico publicado sobre el género, cuyo objetivo fue dilucidar un problema relacionado con la pérdida de la distilia en *E. undulatum* (Berry et al., 1991). Sin embargo no fue una investigación comparativa, porque en la población se presenta solamente un morfo floral.

En el modelo para explicar la evolución de un sistema heterostílico a uno dioico, se asume una esterilidad de los órganos reproductores masculino o femenino en uno u otro de los morfos florales (Ganders, 1979b; Bawa y Beach, 1981). Sin embargo los eventos estructurales que ocurren durante estos procesos no han sido registrados.

Eventos como el desarrollo de las anteras, la formación de los granos de polen, el desarrollo de los óvulos, del saco embrionario, la fecundación, el desarrollo del embrión, del endospermo y de la cubierta seminal, son puntos clave para entender cómo se están comportando los morfos en un sistema heterostílico, que se supone está en transición evolutiva.

EL DESARROLLO DEL ÓVULO

El óvulo se define como el megasporangio (nucela) con sus cubiertas protectoras (tegumentos) y en su interior se desarrolla el megagametofito o saco embrionario (Bouman, 1984). Consiste de tres estructuras básicas: la nucela, uno o dos tegumentos y el funículo. Generalmente una célula de la nucela de posición subepidérmica se diferencia en la célula arqueosporial, la cual puede convertirse directamente en la célula madre de la megaspora (Fig. B1) o puede presentar una división periclinal que origina a una célula parietal de posición subepidérmica y a la célula madre de la megaspora con posición subhipodérmica, la cual entra a meiosis y forma una tétrada de megasporas (Figs. B2, B3).

Generalmente tres megasporas degeneran y la de posición calazal (Fig. B3) origina al saco embrionario mediante tres divisiones mitóticas sucesivas (Fig. B5). El o los tegumentos inician su diferenciación cuando la célula madre de la megaspora entra a meiosis (Fig. B2), cubren a la nucela y forman el micrópilo. La curvatura del óvulo, de la nucela y del saco embrionario, así como la posición del micrópilo y el funículo son características importantes para la clasificación de los óvulos. En la mayoría de las angiospermas el óvulo es anátropo y contiene un saco embrionario tipo Polygonum, que consiste de tres antípodas hacia extremo calazal, una ovocélula y dos sinérgidas hacia el extremo micropilar y una célula central con dos núcleos polares (Maheshwari, 1950; Bouman, 1984; Reiser y Fisher, 1993; Fig. B5).

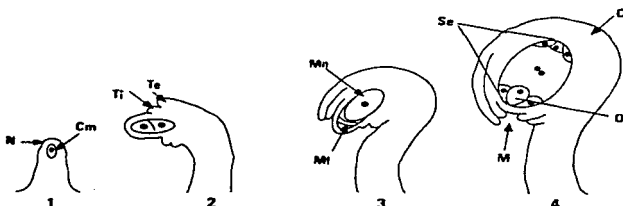


Fig. B. El desarrollo del óvulo (tomado de Reiser y Fisher, 1993). C, calaza; Cm, célula madre de la megaspora; M, micrópilo; Mf, megaspora funcional; Mn, megasporas no funcionales; N, nucela; O, ovocélula; Se, saco embrionario; Te, tegumento externo; Ti, tegumento interno.

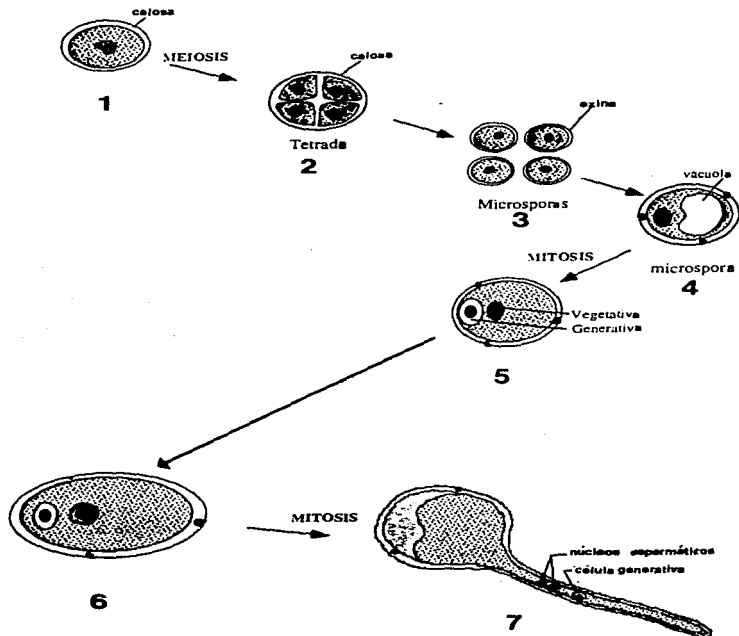
EL DESARROLLO DEL POLEN

El desarrollo de los granos de polen involucra tanto al gametofito como al esporofito e incluye a la microsporogénesis y a la microgametogénesis (Mascarenhas, 1989; McCormick, 1993; Golberg *et al.*, 1993).

La microsporogénesis es la formación de las microsporas (n) dentro de los microsporangios o sacos de polen de la antera, a partir de las células esporofíticas (2n). Después de que se inicia la diferenciación del androceo, la antera consiste de un conjunto de células uniformes, excepto la epidermis que la recubre. Posteriormente, en posición hipodérmica, cuatro grupos de células fértiles o esporógenas inician su diferenciación dentro de la antera. Cada grupo está rodeado por varias capas de tejido estéril que forman la pared de la antera. El tapete es la capa más interna que rodea al esporangio y contiene sustancias nutritivas y de regulación para el desarrollo de las microsporas. Las células esporógenas se convierten en microsporocitos o células madres del polen (2n) (Fig. C1), las cuales al dividirse meióticamente dan lugar a las tétradas de las microsporas (n) (Fig. C2). La microsporogénesis se termina cuando se forman las microsporas unicelulares o granos de polen jóvenes y se inicia la síntesis de la pared del grano de polen (Fig. C3) (Maheshwari, 1950; Bhandari, 1984; Raven *et al.*, 1992; McCormick, 1993; Greyson, 1994).

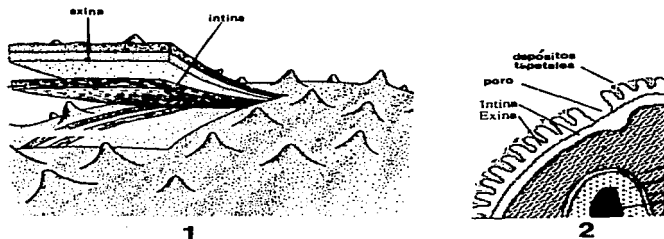
La microgametogénesis es el desarrollo de la microspora en un microgametofito o grano de polen maduro. Inicia cuando la microspora uninucleada (Fig. C4) se divide mitóticamente formando dos células dentro de la pared de la espora original. Una de ellas recibe el nombre de célula vegetativa y la otra de célula generatriz (Fig. C5). En dos terceras partes de las especies de las angiospermas, los granos de polen se dispersan siendo bicelulares (Fig. C6) y la célula generatriz se divide hasta que el tubo polínico crece en el pistilo receptivo (Fig. C7). En el resto de las familias la célula generatriz se divide formando dos células espermáticas, antes de que el grano de polen se disperse (McCormick, 1993). Casi siempre los granos de polen contienen almidón, proteínas o lípidos como material de reserva, dependiendo del grupo al que pertenecen (Laser y Lersten, 1972; Raven *et al.*, 1992; McCormick, 1993).

Fig. C. La microsporogénesis y la microgametogénesis en las angiospermas
(tomado de McCormick, 1993).



La pared de un grano de polen maduro tiene características propias que algunas veces permiten reconocer a la especie. Presenta patrones de ornamentación complejos como espinas, papilas, verrugas u otras proyecciones. Estos patrones de la escultura de la pared celular del grano de polen, son específicos de la especie y están determinados por el esporofito (Chapman, 1987; Raven *et al.*, 1992; McCormick, 1993; Takahashi, 1993). La pared celular del grano de polen presenta dos capas: la intina y la exina (Figs. D1, D2). La *intina* es la capa más interna del polen, adyacente a la membrana plasmática. Es una pared pectoceleulósica sintetizada por el protoplasto de la microspora, que contiene proteínas y es la única pared que se encuentra en las aberturas del polen (Fitzgerald *et al.*, 1993; Greyson, 1994; Fig. D2). La *exina* es la capa más externa de la pared del grano de polen y está formada de esporopolenina (una sustancia compleja formada de carotenoides) resistente a la degradación (Bedinger, 1992), que es sintetizada tanto por el protoplasto del microgametofito como por el tapete (esporofito) (Chapman, 1987; Blackmore y Barnes, 1990; Raven *et al.*, 1992; Figs. D2).

Fig. D. Las paredes celulares de un grano de polen maduro (tomado de Greyson, 1994 y McCormick, 1993).



El tapete es un tejido nutritivo para las esporas, se encuentra en estrecho contacto con los microsporangios desde el desarrollo temprano de las anteras (Pacini *et al.*, 1985). Generalmente es un tejido uniestratificado, pero también puede ser pluriestratificado (Chapman, 1987). El tapete es de considerable significado fisiológico porque todo el material que llega al tejido esporógeno/microsporas/granos de polen, pasa a través de él o se origina en él (Maheshwari, 1950; Pacini, 1990; Pacini y Franchi, 1991; Barnes y Blackmore, 1992; Fosket, 1994). Incluso durante algunas etapas del desarrollo del polen, el tapete acumula sustancias de reserva como lípidos, almidón y/o proteínas dentro y fuera de los plastos, así como polisacáridos en las vacuolas (Pacini *et al.*, 1985).

El tapete es un tejido complejo que está involucrado en diversas funciones, entre ellas: *la nutrición del tejido esporógeno* (Pacini *et al.*, 1985; Chapman, 1987); *la síntesis y la liberación de la calosa*, una enzima codificada nuclearmente (Zhan *et al.*, 1996) y que hidroliza las paredes de calosa para que las microsporas puedan ser liberadas de la tétrada (Izhar y Frankel, 1971; Steiglitz, 1977; Pacini, 1990). La calosa interviene directamente como molde para los patrones de la escultura (ornamentación) de la pared del polen (Vijayaraghavan y Shukla, 1977; Takahashi, 1993); *la formación de los precursores de la exina (la primexina)*, una matriz receptora para que se deposite la esporopolenina (un polímero carotenoide) formada por los orbículos o cuerpos de Ubisch (Bhandari, 1984; Barnes y Blackmore, 1986; Chapman, 1987; Blackmore y Barnes, 1990; Clément y Audran, 1993; Greyson, 1994); *el abastecimiento de polenkit y de trífina* (Bhandari, 1984; Pacini y Franchi, 1993; Hesse, 1993), sustancias que por su naturaleza viscosa unen a los granos de polen en la antera durante el arribo de los polinizadores y durante la dispersión. Estas sustancias atraen a los polinizadores y protegen a los granos de polen contra la radiación solar y la pérdida de agua durante la exposición y el transporte (Hesse, 1993; Pacini y Franchi, 1993). Al parecer, la trífina es necesaria para que los granos de polen germinen en el estigma (Chaudhury, 1993). El tapete también *abastece el grano de polen de sustancias de reconocimiento esporofítico* como enzimas y otras proteínas (Mascarenhas, 1990; Jardinaud *et al.*, 1993), así como *de alérgenos* (Shivanna y John, 1985; Greyson, 1994) y *de flavonoides*, necesarios también para la germinación del polen (Chaudhury, 1993).

Muchas de las etapas del desarrollo de los granos de polen dependen del buen funcionamiento del esporofito (el tapete) y se ha encontrado que cuando no hay armonía en la relación polen-tapete puede existir esterilidad masculina.

Procesos involucrados en la esterilidad masculina

La esterilidad masculina es la incapacidad de producir o liberar polen viable y se ha encontrado en 140 especies de 40 géneros de 20 familias, incluyendo muchas especies cultivadas importantes (Laser y Lersten, 1972). La esterilidad masculina está asociada con el aborto de las células madres del polen, de las microsporas o de los granos de polen maduros (Shivanna y Johri, 1985; Fosket, 1994) debido algunas veces a lesiones en el tapete a nivel de organelos (Warmke y Lee, 1977; Bhandari, 1984; Pacini *et al.*, 1985; Shivanna y Johri, 1985; Bino, 1985, citado en Hesse y Hess, 1993; Suns y Ganders, 1986; Chapman, 1987; Mascarenhas, 1990; Mariani *et al.*, 1991; Greyson, 1994). En la cebada la esterilidad masculina se asocia con una secreción descontrolada de esporopolenina, la cual es producida por los plastidios del tapete. La esterilidad masculina puede ser causada por mutaciones en el ADN mitocondrial (Boeshore, *et al.*, 1985, citado en Conley *et al.*, 1994; Halldén *et al.*, 1991; Chasan, 1992;), cambios en la estructura e hipertrofia de las mitocondrias tapetales (Halldén *et al.*, 1991; Abad *et al.*, 1995 y citas ahí). Las alteraciones mitocondriales están asociadas a las diferencias en la actividad de dos enzimas mitocondriales: la citocromo oxidasa y la malato deshidrogenasa durante el desarrollo del polen entre líneas estériles y fértiles de maíz. En *Petunia* se ha observado que las mitocondrias de las plantas estériles contienen una región de ADN, ausente en líneas fértiles, que codifica para una proteína mitocondrial que afecta la producción energética y en general, el rompimiento de las células tapetales o de las microsporas (Worral *et al.*, 1992).

En algunos casos la ausencia del tapete en las anteras de *Beta vulgaris*, impide la formación de la intina y la exina en las microsporas (Halldén, *et al.*, 1991), o la intina se forma pero la exina presenta malformaciones como en *Vicia faba* (Cerceau-Larrival *et al.*, 1982). En algunas especies las células tapetales de las líneas estériles, son más grandes que las de las líneas fértiles y se extienden hacia el lóculo, las microsporas se liberan tempranamente de la pared de calosa y tienen un desarrollo anormal de la exina y las microsporas se revientan (Steiglitz, 1977; Vijayaraghavan y Shukla, 1977; Chapman, 1987; Worral *et al.*, 1992; Chasan, 1992).

Todas las anomalías que ocurren durante el desarrollo del polen y que son capaces de causar esterilidad masculina representan diferentes mecanismos de regulación genética (Frank, 1989). Existen fuertes evidencias que sugieren que algunos de los genes citoplásmicos son los causantes de la esterilidad masculina en las diversas especies y se localizan principalmente en las mitocondrias (Frank, 1989). La esterilidad masculina se considera citoplásmica, cuando los genes citoplásmicos incluidos en los plastidios o en las mitocondrias son los causantes de dicha esterilidad. El tercer organelo con información genética es el núcleo y por lo tanto, cuando la esterilidad se debe a alguna mutación en el genoma de este organelo, se considera como esterilidad masculina nuclear, la cual es poco frecuente (Saumitou-Laprade *et al.*, 1994; Domínguez, 1995).

II. OBJETIVOS

GENERAL

Comparar el desarrollo embriológico de los morfos florales pin y thrum de *Erythroxylum havanense* para establecer las etapas que puedan explicar la asimetría reproductora de ambos morfos florales.

PARTICULARES

- 1) Estudiar el desarrollo de la antera para establecer las etapas de la microsporogénesis, la microgametogénesis, el desarrollo de la pared de la antera y la morfología del grano de polen maduro.
- 2) Describir el desarrollo del óvulo estableciendo las secuencias de la megasporogénesis, la megagametogénesis y el tipo de óvulo.
- 3) Evaluar el desarrollo del fruto y de la semilla, describir el patrón de la embriogénesis, la endospermogénesis, la cubierta seminal y la pared del fruto.
- 4) Analizar las relaciones que puedan existir entre las diversas etapas del desarrollo de los órganos sexuales y la asimetría reproductora manifestada en los morfos florales pin y thrum.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

SITIO DE ESTUDIO

La población de *Erythroxylum havanense* estudiada se localiza en la Estación de Biología Chamela, una reserva perteneciente al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual se localiza aproximadamente a 2 km de la costa del Estado de Jalisco, México (19° 30' N, 105° 03' W; Fig. E).

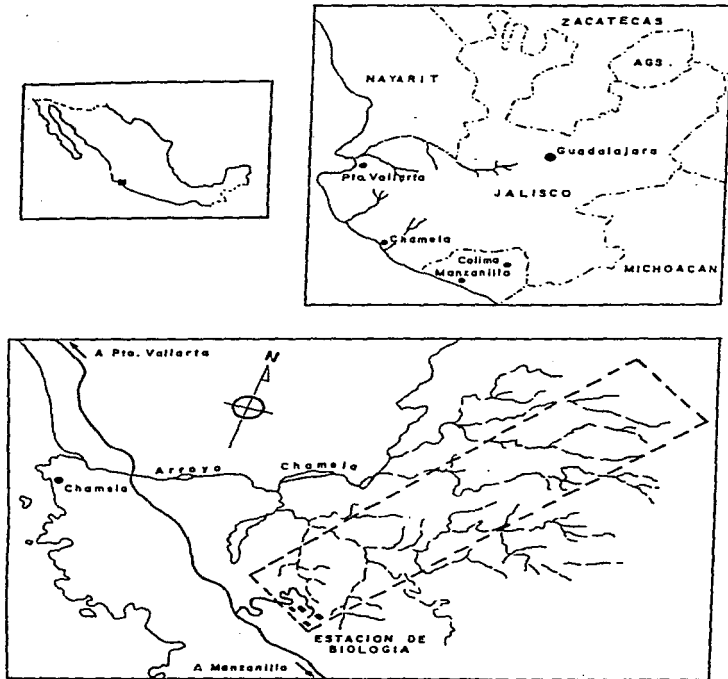
El relieve de la localidad presenta lomeríos bajos. La altitud es de 10 a 584 msnm (Lott *et al.*, 1987). La precipitación promedio anual entre 1977 y 1987 fue de 699 mm (Bullock y Solís-Magallanes, 1990) y de 714 mm entre 1977 y 1990 (S. H. Bullock, comunicación personal, mencionado en Ávila, 1991). El 80% del total de la precipitación cae entre los meses de julio y octubre (Bullock y Solís-Magallanes, 1990).

La temperatura promedio anual es de 24.9 °C, con una gama intermedia entre 14.8 y 32.0 °C. El clima de la región pertenece a los cálido-húmedos (A) (Bullock, 1986). La estación de sequía se extiende de noviembre a mayo.

La vegetación de la región ha sido descrita como bosque tropical caducifolio y bosque tropical subcaducifolio (Rzedowski, 1978). De acuerdo a Lott *et al.* (1987) la vegetación predominante de Chamela es un bosque tropical decíduo en los lomeríos y bosque tropical semidecíduo en los arroyos. El bosque tropical caducifolio es la vegetación dominante en los suelos someros de colinas y pendientes (con vegetación densa, árboles de 4 a 15 m de altura y estrato arbustivo bien representado); mientras que el bosque tropical subcaducifolio se encuentra relacionado con suelos más profundos, pero restringido a los lechos de los arroyos, donde los árboles miden más de 15 m.

En las colinas y pendientes la mayoría de las especies arbóreas pierden las hojas durante la sequía; mientras que en los lechos de los arroyos solamente del 50 al 75% de las especies arbóreas pierden las hojas en dicha época (Lott, 1985; Lott *et al.*, 1987).

Fig. E. Mapa de localización de la Estación de Biología Chamela
(tomado de Lott, 1985)



ESPECIE ESTUDIADA

La familia Erythroxylaceae tiene una distribución pantropical y abarca cuatro géneros: *Aneulophus*, *Nectaropetalum*, *Pinacopodium* y *Erythroxylum*. Este último es el mayor de todos y está constituido por 200 especies que corresponden a más del 95% de las que integran la familia (Cronquist, 1981). Muchas de las especies de este género son heterostilísticas (Ganders, 1979b), aunque también se han reportado ocho especies dioicas en Las Antillas y Centroamérica (Schulz, 1931).

En México, el género está representado por siete especies (Standley, 1923), entre las que se encuentra *E. havanense*. Esta especie es un arbusto que mide aproximadamente 3 m de altura, es perenne, caducifolio, de floración anual, masiva y sincrónica. La floración es efímera; el 70% de las flores de un individuo abren en el mismo día (Dominguez, 1990; Gryj, 1990; Domínguez y Dirzo, 1995). Pierde las hojas durante la temporada de sequía (de diciembre a mayo). Su crecimiento y fecundación están restringidos a los meses de la época de lluvias (de junio a noviembre) de cada año. La eficiencia en la maduración de los frutos es baja, sólo el 14% de las flores producen semillas. El número de flores por individuo no es diferente para pin y thrum, sin embargo, la producción de los frutos maduros es dos veces mayor en las plantas thrum (Dominguez, 1990). Algunas características florales de *E. havanense* se resumen en la tabla 2.

Las investigaciones realizadas sobre el desarrollo de las estructuras reproductoras de la familia Erythroxylaceae son escasas. Los géneros *Aneulophus*, *Nectaropetalum* y *Pinacopodium* han sido escasamente estudiados y para el género *Erythroxylum* la mayoría de los trabajos se han centrado en *E. coca* y *E. novogranatense* (Boesewinkel y Geenen, 1980). Se conocen muy pocas investigaciones sobre otras especies (Narayana, 1960, 1964, 1970; Berry *et al.*, 1991; Davis, 1966; Comer, 1976). Estos trabajos constituyen investigaciones parciales, ya que en ninguno de ellos se aborda el estudio completo del desarrollo. Sobre la embriología de *E. havanense* no encontramos ningún reporte en la literatura consultada.

El estudio del desarrollo de las estructuras reproductoras en los morfos pin y thrum de *E. havanense* desde el estado de botón floral hasta el de la semilla permite entender la asimetría reproductora de los morfos florales de este sistema heterostilístico.

Tabla 2. Características florales de *E. havanense*
(tomado de Domínguez, 1990).

Color de la corola	blanco cremoso
# de partes florales	5 sépalos, 5 pétalos, 10 estambres (5 opuestos a los pétalos y 5 a los sépalos)
Ovario	trilocular, sólo un lóculo forma una semilla. Hay 3 estilos
Antesis	de las 0:00- 2:00h.
Aroma que despiden	dulce
Producción de néctar	3:00-14:00h, la máxima producción es entre las 7:00-7:30h. La composición química del néctar concuerda con el de otras especies polinizadas por abejas
Dehiscencia de anteras	entre las 6:30 y 10:00h
Visitantes nocturnos	palomillas entre 2:00-6:00h (ladrones de néctar)
Visitantes diurnos	entre 8:00-8:30h, himenópteros 94% (86% abejas del género <i>Trigona</i> y el 6% dípteros y mariposas)

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL

El material biológico (yemas, botones florales, flores en antesis y frutos) de *E. havanense* se recolectó en 1993 y 1994, de 24 plantas del morfo pin y 21 plantas del morfo thrum.

Cabe señalar que al inicio de lluvias en 1993, cuando se presentaron las primeras flores abiertas, fue cuando se marcaron las plantas. El marcaje se realizó sobre cintas de plástico, en las cuales estaba impresa una P para el caso de las pin o una T para las thrum. Esto se llevó a cabo porque una vez que las flores se polinizan (el mismo día de la antesis) empieza a desarrollarse el fruto y se caen los estambres. Las flores que no son fecundadas caen el mismo día de la antesis y es difícil distinguir entre los morfos florales.

En la región de Chamela la temporada de lluvias de 1993 se inició el 20 de junio, para el día 25 del mismo mes empezaron a notarse numerosos brotes foliares en las plantas de *E. havanense*.

Entre los días 27 y 29 de julio, podían observarse abiertas algunas brácteas que cubrían a los botones florales de *E. havanense*, permitiendo que los pedicelos se elevaran durante el crecimiento de los botones florales que recién abandonaban la latencia.

La recolecta para obtener todas las etapas de desarrollo del botón floral joven, la antesis y hasta la formación del fruto, se realizó diariamente durante los meses de julio y agosto de 1993 y julio de 1994, en 28 días aproximadamente.

Se pretendía obtener una muestra diaria de 8 a 10 frutos de cada morfo. Sin embargo, en 1993, a los 6 y 7 días después de la floración, el número de frutos por planta fue muy bajo, incluso para estos días algunas plantas ya no tenían ninguno. Esto se atribuyó a que durante los días de la floración pasó un ciclón por la costa de Jalisco (Ayala *et al.*, 1993), evitando así la visita de suficientes polinizadores. Por eso, la muestra promedio para ese año fue de 2 a 3 frutos diarios por cada morfo y para el siguiente año se aumentó la recolecta a 6 frutos diarios aproximadamente.

De cada morfo se fijaron aproximadamente 250 muestras y se procesaron de 4 a 8 muestras por cada etapa (día) de desarrollo. Se establecieron aproximadamente 20 etapas de desarrollo (desde la antesis hasta el fruto maduro). El criterio para considerar a los frutos maduros fue que éstos alcanzaran una longitud aproximada de 7 mm, que es cuando comenzaron a cambiar del color verde al rojo intenso, de un día para otro puede completarse el cambio. Esto ocurrió aproximadamente entre el 18 y 19 de agosto de 1993 y el 4 y 5 de agosto de 1994.

Una vez que los frutos son dispersados se inicia el desarrollo de los nuevos meristemos y los botones florales. Este proceso se interrumpe porque entran en latencia cuando el arbusto comienza a tirar el follaje, lo cual ocurre entre los meses de noviembre y diciembre.

Las etapas del meristemo floral al de botón floral latente fueron colectadas durante los meses de agosto a diciembre de 1993, aproximadamente cada 20 días hasta que los arbustos comenzaron a tirar las hojas.

Se establecieron treinta etapas de desarrollo. Las primeras cinco corresponden al desarrollo de los botones florales, desde los primordios hasta que se desarrollan las anteras y los óvulos y los botones entran en latencia y se cae el follaje. Estas cinco etapas se recolectaron aproximadamente de septiembre a diciembre de 1993 cada 21 días. Las veinticinco etapas restantes corresponden a los botones que pierden la latencia a la siguiente temporada de lluvias y reanudan su crecimiento, se presenta la antesis, la fecundación y el desarrollo de las semillas. Estas etapas se recolectaron desde el inicio de la temporada de lluvias de 1993 y 1994, diariamente hasta la dispersión de los frutos, entre los meses de julio y agosto.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL

1) *Preparación del material vegetal:*

Los botones florales pequeños se encontraron en grupos de aproximadamente 6-8 botones, cada botón rodeado por varias brácteas, las cuales se quitaron para permitir la entrada del fijador. A los frutos maduros también se les hicieron cortes en las partes inferior, superior y laterales. Algunas veces se retiraba completamente el pericarpio para dejar exclusivamente la semilla.

2) *Fijación:* se utilizaron dos fijadores:

- a) FAA (formaldehído 5% + ácido acético 5% + etanol 63% + agua destilada 27%);
- b) glutaraldehído 5% + paraformaldehído 4% + amortiguador de s-coildina 0.1M, pH 7.2, con sacarosa.

3) *Lavado:*

Después de la fijación, las muestras fijadas en FAA se lavaron en agua de la llave, o en amortiguador de coildina las fijadas en glutaraldehído + paraformaldehído para eliminar el exceso del fijador.

4) *Deshidratación:*

La deshidratación del material lavado se llevó a cabo en etanoles graduales para una posterior infiltración.

5) *Infiltración:*

La infiltración es un evento previo a la inclusión, se procedió a colocar los tejidos deshidratados en una mezcla líquida que contenía un solvente del material de inclusión, para que este último pudiera penetrar a las células, para ello se utilizó una mezcla de

xileno-Paraplast (manteniendo una temperatura constante de 50 a 52 °C aproximadamente) y en proporciones decrecientes del solvente y crecientes de paraplast.

En el caso de la inclusión en plástico, la infiltración se realizó pasando directamente los tejidos después del etanol absoluto, a una mezcla de JB-4 sin endurecedor.

6) *Inclusión:* se utilizaron dos materiales de inclusión:

a) *Paraplast:* el material infiltrado hasta Paraplast puro se incluyó en moldes de plástico, dándoles una orientación correcta de acuerdo a los requerimientos de los cortes, dejándose solidificar la parafina a temperatura del ambiente. Se utilizó la técnica de Johansen (1940) para parafina.

b) *JB-4:* otra parte del material vegetal a incluir, infiltrado a temperatura del ambiente en JB-4 sin endurecedor por un mínimo de 8h, se incluyeron en cápsulas de Beem (cápsulas de plástico flexible) que contenían JB-4 con endurecedor y las cápsulas se sellaron. El JB-4 polimerizó a temperatura del ambiente y en ausencia de oxígeno (Valley, 1976).

7) *Obtención y tinción de cortes histológicos:*

Del material incluido en Paraplast se obtuvieron cortes de 8 μm de grosor, con un micrótomos de rotación, se desparafinaron, se hidrataron y se tñeron con safranina-verde rápido en metilcelosolve con aceite de clavo.

Del material incluido en JB-4 se hicieron cortes semifinos (1-2 μm) en un ultramicrotomo Sorvall MT2-B con navajas de vidrio y se tñeron con azul de toluidina con borato de sodio.

8) *Observación:*

a) las laminillas obtenidas se observaron por microscopía fotónica y se tomaron fotomicrografías.

b) los granos de polen maduros teñidos y sin teñir se observaron por medio de microscopía de polarización para evidenciar los granos de almidón de la célula vegetativa.

c) parte del material fresco y fijado (botones florales, frutos y granos de polen), se deshidrató en etanoles graduales y acetona pura, se desecaron a punto crítico, se pegaron en portamuestras con adhesivo, y se recubrieron con oro, para su observación en un microscopio electrónico de barrido JEOL JMS-35.

Las muestras de polen para microscopía de luz se obtuvieron de botones florales poco antes de la antesis, se deshidrataron y se acetolizaron siguiendo la técnica de Erdtman (1943), previo tratamiento con KOH al 10% y los granos de polen se montaron

en gelatina glicerinada. Las medidas se hicieron en 20 granos de polen tomados al azar de diversos individuos para cada uno de los morfos. Se aplicó una prueba de t (student) para analizar los resultados.

IV. RESULTADOS

En los seis primeros apartados se describe el desarrollo embriológico que fue común a ambos morfos florales de *E. havanense*, y en el séptimo apartado se mencionan las diferencias.

LA APARICIÓN DE LOS VERTICILLOS FLORALES

Los botones florales que entran en latencia cuando inicia la temporada de sequía reactivan su crecimiento y se presenta la floración, estimuladas por la humedad de la nueva temporada de lluvias.

El desarrollo de los verticilos florales muestra que en los botones, los primordios de los diez estambres se diferencian como protuberancias del receptáculo un poco antes que el gineceo (Fig. 1). Del centro del meristemo surgen los primordios de los carpelos, generalmente se observan tres (Fig. 2), sin embargo, en menos de un 5% de las muestras estudiadas se encontraron flores con cuatro carpelos en desarrollo (Fig. 1). Los sépalos y los pétalos cubren los estambres y los carpelos en desarrollo.

LA ORGANIZACIÓN DEL MERISTEMO FLORAL

Los botones florales pequeños se observan en conjuntos de 6 a 8, rodeados por muchas brácteas que contienen taninos, suberina y cristales poligonales (Fig. 3). En las yemas florales se observa al meristemo cubierto por los sépalos, cuyos ápices presentan células de apariencia digitiforme y con taninos. El meristemo central se encuentra formado por una protodemis que rodea a un conjunto de células en intensa actividad mitótica (Fig. 4).

Posteriormente, los estambres también se elevan del receptáculo como promontorios celulares que comienzan a ensancharse radialmente en su parte apical para formar a las anteras (Fig. 5). Durante la ontogenia, en el meristemo floral hay un crecimiento diferencial, que conduce a la aparición de varios promontorios y pronto comienza a diferenciarse el cuarto verticilo (el gineceo), ya que se observan los primordios carpelares en la parte central (Fig. 6).

EL DESARROLLO DE LA ANTERA

Durante la temporada de lluvias (aproximadamente en agosto), los estambres comienzan a desarrollarse y la parte apical de éstos se ensancha para formar las anteras. En cada primordio de antera se observa una protodermis que rodea el arquesporio, el cual por divisiones periclinales origina dos tejidos: el más interno se especializa como tejido esporógeno y el más externo, en posición subepidérmica como tejido parietal primario (Fig. 7), del cual se formará la pared de la antera, que en esta etapa comienza a alargarse (Fig. 8).

La microsporogénesis

Las células arquesporiales se multiplican mitóticamente, aumentan de tamaño, convirtiéndose en las células madres de las microsporas, evidenciándose el núcleo y el citoplasma denso. Las células madres de las microsporas se preparan para la meiosis depositando calosa alrededor (Fig. 9). En la meiosis I se forman las diadas (Fig. 10). El resultado final es una tétrada de microsporas del tipo tetrahédrico o algunas veces isobilateral (Fig. 11). Cada una de las tétradas se encuentra rodeada por una pared de calosa y cuando ésta se degrada, se observan a las microsporas con su pared de exina ya formada (Fig. 12). Las células tapetales se rompen para vertir su contenido al lóculo. Se observan muchos cuerpos de Ubisch, primero en el interior de las células rotas del tapete (Fig. 13) y posteriormente sobre la pared de los granos de polen jóvenes (Figs. 14, 15).

La microgametogénesis

Una vez que se separan las microsporas de las tétradas, se presenta la primera división mitótica y se tiene como resultado un grano de polen binucleado, que es la condición en la que se dispersan (Fig. 16). El grano de polen listo para su dispersión es tricolorado y en su interior hay muchos granos de almidón (Fig. 17, 18). En cada grano de polen ellos se observan claramente la intina y la exina (Fig. 17).

Cuando los granos de polen jóvenes son liberados de las tétradas, tienen una forma casi esférica y se pueden detectar los colpo, las membranas de los poros en posición ecuatorial y la ornamentación de los colpo (Fig. 19). Los granos de polen pierden agua para poder dispersarse, trayendo como consecuencia una inversión de la pared celular, cubriéndose los colpo y los poros. De esta manera, el grano de polen

toma un perfil elíptico y en lugar de las aberturas se observan surcos. Los extremos polares son aplanados (Fig. 20).

La ornamentación de la exina varía entre los morfos, el polen del morfo thrum tiene una exina con escultura verrugada (Fig. 21), mientras que en el morfo pin la ornamentación es reticulada (Fig. 22). Esta ornamentación se observa desde que las microsporas salen de la tétrada (Fig. 12). No se observaron diferencias significativas con respecto al tamaño de los granos de polen entre los dos morfos (pin, $X = 35.85$, $EE = 2.4$; thrum $X = 35.7$, $EE = 1.5$; $t = 0.178$; $p = 0.178$; $gl = 38$).

El desarrollo de la pared de la antera

El tejido parietal primario de posición hipodérmica se divide periclinalmente formando dos tejidos, uno interno que funcionará como tapete y otro externo, el cual recibe el nombre de tejido parietal primario (Fig. 23). El parietal primario se divide nuevamente, originando ahora el endotecio, el cual se localiza adyacente a la epidermis, y a la capa media (Fig. 24), la cual puede dividirse una o dos veces más, siendo al final una capa media bi- o triestratificada (Fig. 25). El desarrollo de la pared de la antera obedece al tipo dicotiledóneo.

Una vez diferenciados los tejidos de la pared de la antera, se observa la epidermis uniestratificada, un endotecio uniestratificado con células que contienen almidón en su interior, una capa media uniestratificada y un tapete uniestratificado de células binucleadas (Fig. 26).

El tapete y la capa media se reabsorben y en la antera madura, sólo hay una epidermis y un endotecio con engrosamientos lignificados en sus paredes en forma de bandas y almidón en su interior (Figs. 27, 28).

La antera madura es bilobulada y tetrasporangiada. Cada uno de los lóbulos presenta una zona de adelgazamiento del endotecio y de la epidermis, que corre a lo largo de la antera y recibe el nombre de estomio, zona por la cual se rompe la pared de la antera para permitir la salida de los granos de polen para ser dispersados (Fig. 29).

EL DESARROLLO DEL GINECEO

El desarrollo del óvulo

En botones florales jóvenes los primordios de los carpelos rodean la nucela. Generalmente, se desarrolla un sólo primordio ovular por lóculo (Fig. 30). En muy pocos

casos se observaron dos nucelas en un carpelo fértil (Fig. 31). Cada nucela comienza a crecer distalmente, en el mismo sentido que los carpelos (Figs. F1, 30, 32), pero al cerrarse éstos para formar el ovario, el óvulo cambia su orientación de crecimiento, comienza a curvarse y se dirige hacia la base del ovario. Es entonces cuando se inicia el desarrollo de los dos tegumentos del óvulo, ambos de origen dérmico (Figs. F2, 32). Casi al mismo tiempo se diferencia la célula arqueosporial en posición hipodérmica y aumenta de tamaño. Ésta se divide formando dos células: una parietal localizada por abajo de la epidermis y la célula madre de la megaspora (Fig. 33). La célula parietal se divide mitóticamente, proliferando en una nucela abundante, lo cual trae como consecuencia que la célula madre de la megaspora tenga una posición profunda en la nucela (4 ó 5 estratos más abajo de la epidermis), alejada de su posición hipodérmica original. Otra vez, el óvulo se curva hacia la región de la inserción de los estilos y para entonces se distinguen claramente los dos tegumentos (Figs. F3, 34, 35).

El óvulo en una flor en antesis es pendulado, crasinucelado, anátropo, bitégmico y sésil. La placentación es axial aunque parezca parietal debido a la desaparición de los otros dos lóculos, que al colapsarse se confunden con la pared del ovario, dejando como huella únicamente los haces vasculares de la placentación. El óvulo abarca casi todo el lóculo. El micrópilo, formado por el tegumento interno, se orienta en dirección a la inserción de los estilos. La nucela es muy abundante hacia la zona calazal, estando ausente en la zona micropilar, donde se localiza el saco embrionario. Los tegumentos son pluriestratificados y las células de la epidermis interna del tegumento interno (adyacente a la nucela), se observan con citoplasma denso, formando un endotelio o tapete tegumentario (Figs. F4, 35).

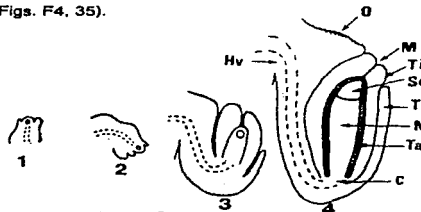


Fig. F (1-4). El desarrollo del óvulo. C, cálaza; Hv, haces vasculares; M, micrópilo; N, nucela; O, Obturador; Se, saco embrionario; Ta, tapete tegumentario; Ti, tegumento interno; Te, tegumento externo.

En un corte longitudinal de botón floral, cerca de la antesis (a principios de la siguiente temporada de lluvias), se observa de afuera hacia adentro el cáliz, la corola con apéndices hacia la cara adaxial de cada pétalo, un androceo con los granos de polen maduros y un gineceo formado por un ovario que contiene un óvulo, tres estilos y tres estigmas (Fig. 34). Las células epidérmicas apicales de los sépalos se alargan tomando apariencia digitiforme y contienen taninos (Fig. 36).

La megagametogénesis

No se observó la megaspora que le da origen al saco embrionario, pero éste presenta el arreglo similar al tipo *Polygonum*. Es heptacelular y octanucleado. Hacia la zona calazal se observaron tres antípodas, en la parte media los dos núcleos polares de la célula central y hacia la zona micropilar las dos sinérgidas (Fig. 37) y la ovocélula (Fig. 38).

El ovario es trilobular, tricarpelar (Fig. 39) y cada carpelo se prolonga en un estilo que termina en un estigma globoso y papilado (Fig. 40). En ambos morfos florales, los estigmas son similares. Generalmente sólo uno de los carpelos es fértil y forma un óvulo. El ovario en su etapa madura presenta un lóculo, porque sólo uno de los tres carpelos que lo forman es fértil (Fig. 39). Algunas veces dos lóculos inician el desarrollo del óvulo, pero uno pronto degenera (Fig. 41). En muy pocos casos se observaron dos óvulos en el carpelo fértil (Fig. 42). Se desarrolla un pequeño obturador en el tegumento externo, cercano a la zona de inserción con la placenta. Sus células son ligeramente digitiformes (Figs. F4, 43).

EL DESARROLLO DE LA SEMILLA

La antesis se presenta aproximadamente al quinto día de iniciada la temporada de lluvias, ocurriendo la fecundación y una diferenciación en los diversos estratos de los tegumentos: el tegumento externo (ahora testa) y el tegumento interno (ahora tegmen) (Fig. 44). Las células de la exotesta uniestratificada se alargan longitudinalmente y en ella se encuentran grandes cantidades de taninos; la mesotesta, formada de 3-6 estratos parenquimáticos (Figs. 45-47), o por más en la zona de la rafe, donde se encuentran los dos haces vasculares en la rafe (Fig. 44), ambos rodeados por células taniníferas; la endotesta es uniestratificada y está formada por células parenquimáticas (Figs. 44-46).

El exotegmen es uniestratificado y de células parenquimáticas. El mesotegmen presenta de 5 a 6 estratos de células parenquimáticas. El endotegmen (endotelio) es uniestratificado y de células cúbicas. La nucela comienza a degradarse en la zona micropilar, pero hacia la zona calazal permanece intacta y formada por 6-7 estratos celulares (Fig. 44).

El tegmen presenta algunas modificaciones. Las células parenquimáticas del exotegmen crecen en sentido del eje mayor de la semilla (Fig. 45), posteriormente sus células comienzan a lignificarse. En el exotegmen se forman depresiones hacia el mesotegmen (Fig. 46). El mesotegmen, formado por varios estratos de células parenquimáticas de paredes muy delgadas y grandes espacios intercelulares; es la capa que más estratos tiene en un principio. Las células del endotegmen o endotelio contienen taninos. La nucela, localizada hacia la zona calazal, comienza a degradarse (Fig. 45).

Al final del desarrollo el mesotegmen se degrada casi completamente. En el endotegmen, primero el contenido celular se consume, posteriormente las paredes celulares se colapsan. La cubierta de la semilla madura, por lo tanto está formada sólo por la testa (con sus tres capas) y el exotegmen con estereidas lignificadas y con engrosamientos traqueoidales, representando la única capa resistente de la cubierta seminal (Fig. 47).

La embriogénesis

La primera división del cigoto (transversal) se lleva a cabo un día después de la fecundación, originando una célula basal pequeña localizada cerca del micrópilo y una célula apical de mayor tamaño hacia la zona calazal. La diferencia en el tamaño de estas células es interesante ya que generalmente la célula basal es más grande que la apical (Fig. 48). Al cuarto día se observa un embrión globular (Fig. 49), al octavo un acorazonado (Fig. 50) y al noveno día inicia el desarrollo de un embrión con un eje cilíndrico con dos cotiledones largos (Fig. 51). El embrión cotiledonario aparece a los trece días después de la antesis, es recto, presenta un eje hipocótilo radicular y dos largos cotiledones foliosos muy bien distinguidos veinte días después de la antesis y que contienen proteínas y almidón (Fig. 52).

La endospermogénesis

El desarrollo del endospermo es del tipo nuclear y comienza el mismo día de la fecundación y antes de la primera división del cigoto. Los núcleos libres se distribuyen alrededor de una vacuola central (Fig. 53), pero posteriormente se va celularizando, desplaza la nucela hacia la cámbia y entra en contacto directo con el endotelio, cuyo contenido de taninos va desapareciendo durante el desarrollo (Figs. 50, 51). El endospermo celular (Fig. 52) es almidonoso y se va consumiendo durante el desarrollo del embrión. Al final sólo permanecen pocos estratos celulares con inclusiones principalmente proteicas.

EL DESARROLLO DEL FRUTO

Cuando se desarrolla una sola semilla por fruto, el crecimiento de ésta origina que los lóculos estériles se colapsen y formen parte del pericarpio, quedando sólo las huellas de los haces vasculares (Fig. 44) y algunas veces un pequeño espacio cerca de la inserción de los estilos (Figs. 39, 41).

El pericarpio joven está formado por células parenquimáticas principalmente. La epidermis o exocarpio es uniestratificado, pero posteriormente se divide para formar una epidermis pluriestratificada. El mesocarpio está formado por 14-16 estratos celulares en la zona opuesta a la placentación del óvulo. En la zona donde se colapsan los lóculos estériles, el número de estratos del mesocarpio es superior a 20. El estrato externo del mesocarpio presenta células parenquimáticas alargadas perpendicularmente al eje mayor del fruto; sus células tienen apariencia secretora (Fig. 45), en ellas se observa una gran cantidad de cuerpos lipídicos. En la parte media del mesocarpio se localizan aproximadamente 12 haces vasculares (4 por carpelo). En el sitio donde se colapsan los lóculos estériles las células parenquimáticas presentan numerosos espacios intercelulares como un aerénquima (Fig. 46, cabeza de flecha). El resto del mesocarpio es de células parenquimáticas e isodiamétricas, a excepción del estrato más interno (y adyacente al endocarpio), cuyas células están alargadas en sentido del eje mayor del fruto y cuyo citoplasma y paredes se tiñen densamente. El endocarpio es uniestratificado y está formado de células casi isodiamétricas y lignificadas (Figs. 47, 54).

LAS DIFERENCIAS DURANTE EL DESARROLLO DE LAS ANTERAS ENTRE LOS MORFOS PIN Y THRUM

Durante el estudio del desarrollo de los morfos se observaron diferencias significativas entre ellos. El primer evento observado fue el número de anteras abortivas, que fue mayor en el morfo thrum que en el pin. La región que corresponde al tejido esporógeno se observó completamente colapsada al inicio de la meiosis, no había tapete ni granos de polen formados (Fig. 55).

Segundo, durante la meiosis, en algunos lóculos de las anteras thrum no hubo tapete (Fig. 56) o estuvo completamente ausente en todos los lóculos (Fig. 57). En etapa de tapete uninuclear, las tétradas fueron anormales, y la exina uniforme (sin ornamentación al observarse en microscopio de luz), y el contenido celular de cada microspora se encontró colapsado (Fig. 58). También durante la etapa meiótica, algunas microsporas permanecieron unidas en tétradas por medio de puentes citoplásmicos y la calosa fue muy gruesa (Fig. 59).

En etapa de microspora bicelular algunos granos de polen presentaron el citoplasma fuera de los límites de la exina (Fig. 60), así como una gran cantidad de granos de polen pequeños y vacíos (Fig. 61).

Granos de polen jóvenes que ya deberían corresponder a mónadas permanecieron unidos en diadas, ellas compartían la misma pared celular, pero sólo presentaron dos núcleos, sin embargo almacenaron almidón (Fig. 62).

En este morfo thrum, muchos granos de polen mal formados y aglutinados, formaron una masa de granos de polen bicelulares, con abundantes reservas de almidón, pero sin aberturas (Fig. 63).

En un mismo lóculo de antera pudieron observarse granos de polen normales y anormales (pequeños, colapsados y con exina mal formada, en lugar de presentar verrugas, se observaron protuberancias globosas) (Fig. 64).

Finalmente, se detectó una alta proporción de granos de polen amorfos y vacíos (Fig. 65).

En algunas anteras abortivas del morfo thrum, el tapete se hipertrofió. Sus células fueron grandes y vacuoladas en la etapa de diada (Fig. 66). La figura 10 muestra una diada normal del morfo pin. En el interior de cada una de las microsporas y antes de que se formara la exina, se observaron vacuolas tanto en el tapete como en cada una de las

microsporas (Fig. 66), las cuales no se manifestaron en las microsporas normales del morfo pin (Figs. 11).

Todas estas anomalías durante el desarrollo de los granos de polen repercuten en la disfuncionalidad del morfo thrum como donador de polen, ya que esto representa esterilidad masculina parcial, poniéndolo en desventaja con el morfo pin, que no presenta este problema.

LÁMINA 1.- Figuras 1-6. La morfología de los botones florales.

- Fig. 1.** Un botón floral con los sépalos (S) removidos para observar los primordios de los pétalos (Pp), de los estambres (Pe) y de los cuatro carpelos (Pc). MEB, escala = 50 μm .
- Fig. 2.** Un primordio de ovario con tres carpelos (Pc) en formación y la nucela (N). MEB, escala = 22.7 μm .
- Fig. 3.** Un conjunto de botones florales cubiertos por muchas brácteas (Br), escala = 53 μm .
- Fig. 4.** Un botón floral con los primordios de los pétalos (Pp) y con células taniníferas en los sépalos (S), escala = 24 μm .
- Fig. 5.** Corte longitudinal de botón floral con los sépalos (S), los pétalos (P) con células epidérmicas digitiformes y los primordios de los estambres (Pe), escala = 32 μm .
- Fig. 6.** Los primordios de los estambres (Pe) y los carpelos (Pc), escala = 32 μm .

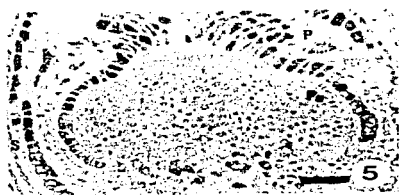
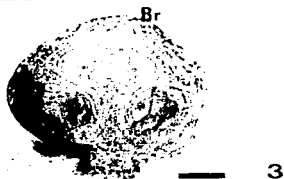
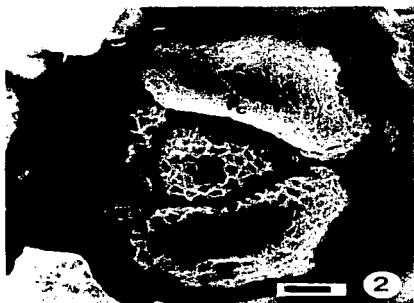


LÁMINA 2.- Figuras 7-14. La meiosis de las células madres de las microsporas.

Fig. 7. Las divisiones periclinales del tejido arquesporial (Ta) en las anteras. P, pétalo, escala = 8 μm .

Fig. 8. Corte longitudinal de la antera mostrando las divisiones del tejido arquesporial (Ta) para originar la capa parietal primaria (Cp), escala = 8 μm .

Fig. 9. Las células madres de las microsporas (Cm), escala = 4 μm .

Fig. 10. La meiosis I de las células madres de las microsporas formando una diada rodeada de calosa (Ca), escala = 3.8 μm .

Fig. 11. Tétradas isobilaterales, = 3.8 μm .

Fig. 12. Las microsporas al final de la etapa de tétrada del morfo pin con la exina reticulada y los restos de la calosa (Rc), escala = 9 μm .

Fig. 13. Los cuerpos de Ubisch (U) en las células rotas del tapete, escala = 8 μm .

Fig. 14. Un grano de polen del morfo thrum con los cuerpos de Ubisch (U) sobre la exina verrugada, escala = 5.5 μm .

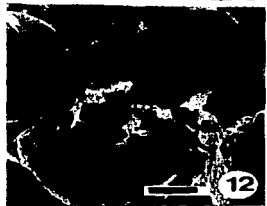
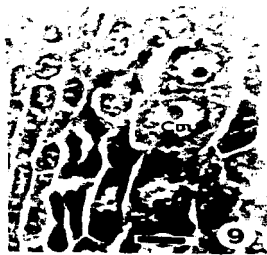


LÁMINA 3.- Figuras 15-22. El desarrollo y la morfología de los granos de polen.

Fig. 15. Las microsporas jóvenes libres cubiertas por los cuerpos de Ubisch (U), escala = 16. μm .

Fig. 16. Grano de polen bicelular, escala = 6.2 μm .

Fig. 17. Un grano de polen tricolporado con la intina (flecha) y la exina (cabeza de flecha), escala = 8.8 μm .

Fig. 18. Grano de polen con granos de almidón en su interior. Microscopía de polarización, escala = 35.3 μm .

Fig. 19. Un grano de polen joven hidratado del morfo pin con la ornamentación del colpo (Co), la membrana del poro (Po) y la exina reticulada. MEB, escala = 5 μm .

Fig. 20. Granos de polen del morfo pin deshidratados en vista polar y ecuatorial (las aberturas se han cerrado). MEB, escala = 6.3 μm .

Fig. 21. Grano de polen del morfo thrum con la exina verrugada. MEB, escala = 5 μm .

Fig. 22. Grano de polen del morfo pin con la exina reticulada. MEB, escala = 4.5 μm .

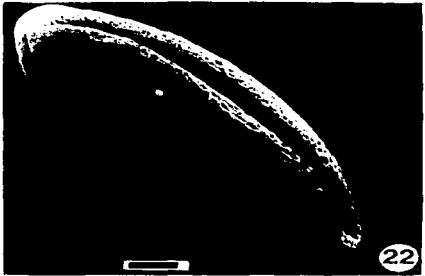
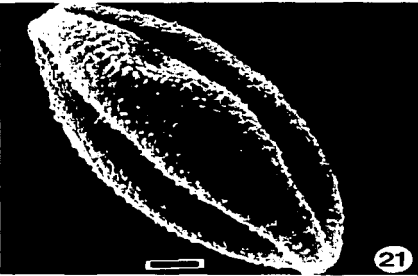
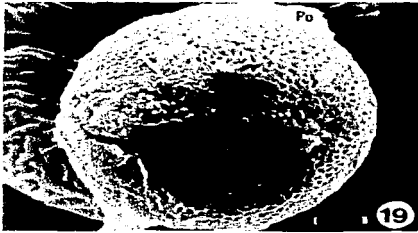
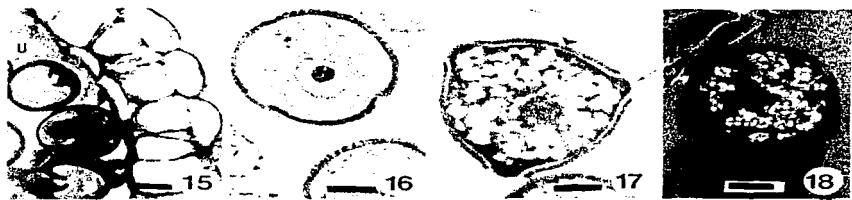


LÁMINA 4.- Figuras 23-30. El desarrollo de la pared de la antera y de los primordios carpelares.

- Fig. 23.** Corte longitudinal de la antera con la epidermis (E), los pétalos (P) y el tejido arquesporial en división (Ta), escala = 4 μm .
- Fig. 24.** La pared de la antera es del tipo dicotiledóneo con el endotecio (En), la capa media (Cd), la célula madre de la microspora (Cm) y los pétalos (P), escala = 5.5 μm .
- Fig. 25.** Los pétalos (P) cubriendo la pared de la antera joven con la capa media (Cd) biestratificada, escala = 12 μm .
- Fig. 26.** La pared de la antera en desarrollo avanzado mostrando una epidermis (E), el endotecio (En) con plastos, la capa media (Cd) en degradación y el tapete binucleado (T), escala = 12 μm .
- Fig. 27.** La pared de la antera madura mostrando el endotecio (En) y los restos del tapete (T), escala = 6 μm .
- Fig. 28.** Acercamiento del endotecio con las paredes celulares engrosadas (Pn) y los plastos (flecha), MEB, escala = 8 μm .
- Fig. 29.** La antera madura es bilobulada y tetrasporangiada. Las flechas muestran el estomio de cada lóbulo (flechas), escala = 21.5 μm .
- Fig. 30.** Corte longitudinal de los primordios de los carpelos (Ca) y la nucela (N), escala = 21 μm .

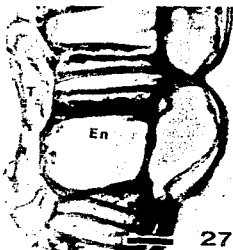
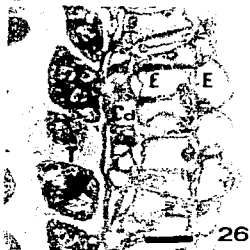


LÁMINA 5.- Figuras 31-38. El desarrollo del óvulo.

Fig. 31. Dos nucelas (N) en desarrollo y los primordios carpelares (Pc), escala = 21 μ m.

Fig. 32. El primordio ovular. El óvulo se curva y se inicia el desarrollo de los tegumentos (flechas). Pc, primordio carpelar, escala = 21 μ m.

Fig. 33. La división de la célula arqueosporial en célula madre de la megaspora (Cm) y célula parietal (Cp) abajo de la epidermis (E). Pt, primordio del tegumento interno, escala = 8.2 μ m.

Fig. 34. Corte longitudinal del botón floral con un óvulo desarrollado. Es, estilo; Eg, estigma y los apéndices en la base de los pétalos (flecha), escala = 70 μ m.

Fig. 35. Corte longitudinal del ovario (Ov) mostrando la pared del ovario (Po), el óvulo maduro y el saco embrionario (Se), escala = 18.8 μ m.

Fig. 36. Acercamiento de los estambres, la corola y el cáliz. Los sépalos presentan células digitiformes en la parte apical (flecha). escala = 24 μ m.

Fig. 37. La zona micropilar del saco embrionario con las sinérgidas (S) y el tapete tegumentario (Tt), escala = 33 μ m.

Fig. 38. La zona micropilar del saco embrionario con la ovocélula (O) y el tapete tegumentario (Tt), escala = 33 μ m.

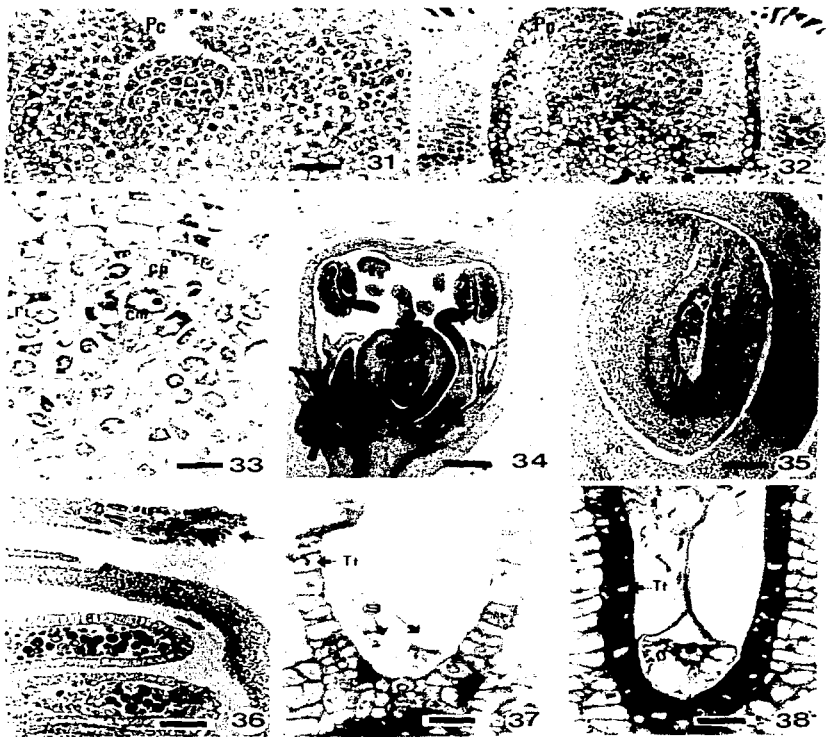


LÁMINA 6.- Figuras 39-47. El desarrollo del fruto y de la semilla.

Fig. 39. Corte transversal de una flor joven con ovario joven trifóculo (Po) con un sólo lóculo fértil y dos lóculos estériles (*), escala = 30 μ m.

Fig. 40. El estigma con granos de polen (flechas). MEB, escala = 3 μ m.

Fig. 41. Corte transversal de un ovario de flor en anthesis. Dos de los lóculos son fértiles, escala = 28 μ m.

Fig. 42. Corte transversal del ovario con un lóculo fértil en el cual se desarrollan dos óvulos, escala = 30 μ m.

Fig. 43. Corte longitudinal de la parte distal del ovario donde se implanta el óvulo; el obturador (flecha) se localiza cerca del micrópilo (Mi), escala = 22. μ m.

Fig. 44. Corte transversal del ovario con un óvulo mostrando la nucela (N), el tegumento interno (Ti), el tegumento externo (Te) y la rafe (R). Las flechas señalan los lóculos obliterados, escala = 15 μ m.

Fig. 45. Corte longitudinal del fruto con la semilla joven en la zona del antraxo mostrando la pared del ovario (Po), la testa (Tx), el mesotegmen (Mt), el exotegmen (flecha), el tapete tegumentario (Tt) y la nucela (N) en degeneración, escala = 15 μ m.

Fig. 46. Corte longitudinal del fruto con la semilla en etapa avanzada. El exotegmen se ha lignificado (flecha), el mesotegmen (Mt) y el contenido del tapete tegumentario (Tt) se degradan, escala = 18 μ m.

Fig. 47. La cubierta seminal está formada por la testa (Tx) y el exotegmen lignificado (Et). Endocarpio lignificado (flecha), escala = 8 μ m.

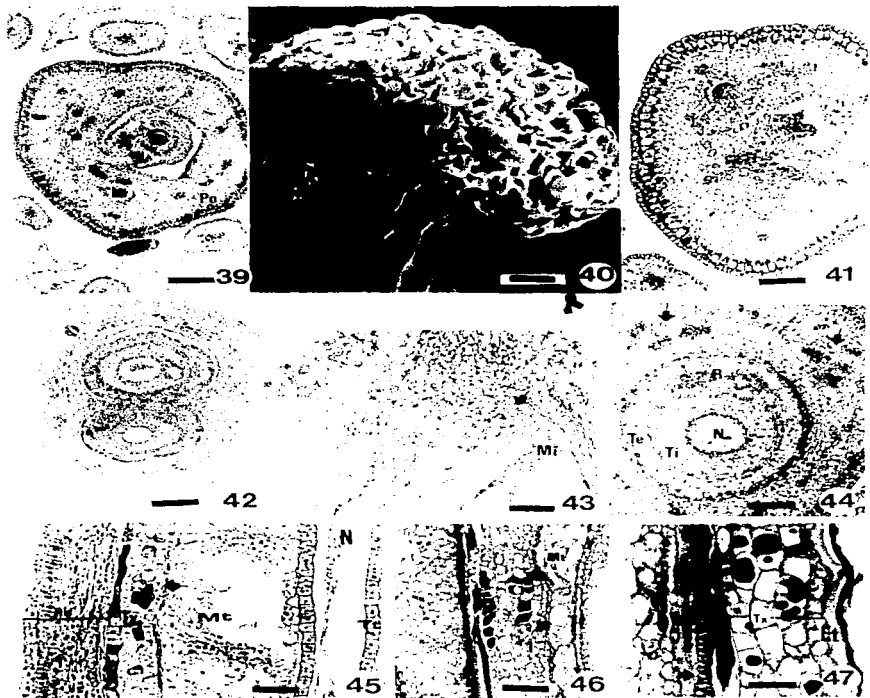


LÁMINA 7.- Figuras 48-56. La embriogénesis, la endospermogénesis y las anteras abortivas.

Fig. 48. La primera división del cigoto. La célula apical (Ca) es de mayor tamaño que la basal, escala = 36. μm .

Fig. 49. El embrión globular, escala = 36. μm .

Fig. 50. El embrión acorazonado ocho días después de la fecundación, escala = 10 μm .

Fig. 51. El embrión diez días después de la fecundación, rodeado por el endospermo celular (Ec) y tapete tegumentario (Tt). Co, cotiledón, escala = 13.3 μm .

Fig. 52. Corte longitudinal del fruto con el embrión cotiledonario veinte días después de la fecundación y rodeado por el endospermo celular (Ec), escala = 450 μm .

Fig. 53. El endospermo en etapa de núcleos libres (flechas) rodeado por el tapete tegumentario (Tt), escala = 33 μm .

Fig. 54. La pared del ovario con el endocarpio (Ed) lignificado. MEB, escala = 8 μm .

Fig. 55. Corte longitudinal de un lóculo estéril de una antera del morfo thrum, escala = 42.2 μm .

Fig. 56. Corte transversal de la antera con células en etapa de meiosis mostrando un lóculo normal con el tapete (T) y otro estéril (Le) sin tapete, escala = 42.2 μm .

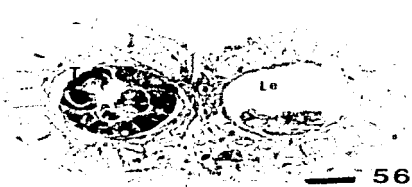
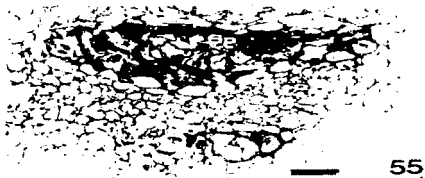
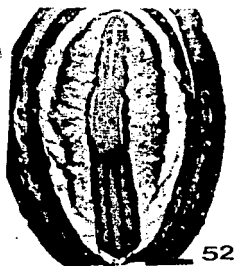
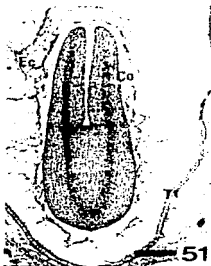
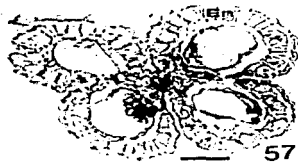


LÁMINA 8.- Figuras 57-66. Las anomalías en el androceo del morfo thrum.

- Fig. 57.** Una antera con todos los lóculos abortivos, corresponde a una etapa de células madres de las microsporas en meiosis. En, endotecio, escala = 27 μm .
- Fig. 58.** Una tétrada de microsporas abortivas. El citoplasma está colapsado y no se observa ornamentación en la exina, escala = 35 μm .
- Fig. 59.** Tétradas abortivas, manteniéndose las microsporas unidas por puentes citoplásmicos (flecha). El citoplasma es muy denso y no hay exina, escala = 35 μm .
- Fig. 60.** Un grano de polen en etapa bicelular con el citoplasma fuera de los límites de la exina (flecha), escala = 35.3 μm .
- Fig. 61.** Granos de polen vacíos y pequeños, escala = 55.5 μm .
- Fig. 62.** Granos de polen que permanecen unidos compartiendo un citoplasma con granos de almidón (G) y rodeados por una exina y una intina comunes, escala = 35.3 μm .
- Fig. 63.** Granos de polen aglutinados, escala = 54 μm .
- Fig. 64.** Granos de polen normales con la exina verrugada y granos de polen abortivos en el mismo lóculo de una antera thrum. Exina anormal (flecha), escala = 11.4 μm .
- Fig. 65.** Granos de polen amorfos y sin granos de almidón, escala = 35.3 μm .
- Fig. 66.** Hipertrofia de las células tapetales (T) durante la meiosis de las células madres de las microsporas. V, vacuolas; En, endotecio, escala = 55 μm .



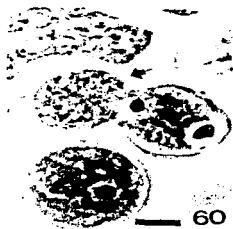
57



58



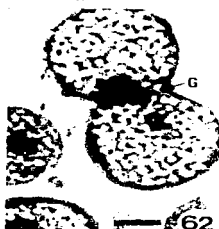
59



60



61



62



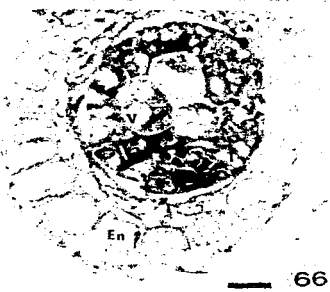
63



64



65



66

V. DISCUSIÓN

Durante la investigación bibliográfica que sirvió de marco teórico para esta tesis, no se encontraron publicaciones que abordaran el estudio de la asimetría reproductora en especies heterostilísticas, desde la perspectiva embriológica. Este enfoque se desarrolla por primera vez en esta investigación.

Los hallazgos obtenidos al estudiar el desarrollo reproductor de los dos morfos en *Erythroxylum havanense*, se compararon con los estudios correspondientes a otras especies del género. Estos coinciden, en general, en: la estructura y el desarrollo de la antera, el grano de polen joven, el desarrollo del óvulo, la organización del saco embrionario, la embriogénesis y el desarrollo de la semilla (Narayana, 1960, 1964, 1970; Corner, 1976; Boesewinkel y Geenen, 1980).

Davis (1966) y Cronquist (1981) mencionan que el género *Erythroxylum* tiene óvulos tanto anátropos como hemianátropos, sin embargo nunca puntualizan si en una misma especie se pueden presentar ambos tipos de óvulos o las distintas especies tienen uno u otro tipo. Todas las especies del género *Erythroxylum* en las cuales se ha estudiado el desarrollo del óvulo, sólo presentan el tipo anátropo, lo cual coincide con *E. havanense* (Narayana, 1960, 1964, 1970; Corner, 1976; Boesewinkel y Geenen, 1980; Berry *et al.*, 1991).

En *E. havanense* se observaron tétradas de microsporas tetrahédricas e isobilaterales. Siempre se han descrito tétradas de microsporas tetrahédricas para las especies del género, excepto para *E. lanceum*, que además presenta tétradas en decusada (Rao, 1966, citado en Narayana, 1970). Los granos de polen de *E. havanense* son bicelulares al momento de la dispersión, mientras que para el resto de las especies del género estudiadas se han encontrado granos de polen tricelulares (Narayana, 1960, 1964, 1970; Davis, 1966).

Las especies del género *Erythroxylum* presentan un ovario trilocular y tricarpelar (Narayana, 1960, 1964, 1970; Boesewinkel y Geenen, 1980). En *E. havanense* y en algunas especies mencionadas por Corner (1976), se observaron muy esporádicamente cuatro carpelos. Cuando el ovario es trilocular sólo se desarrolla un óvulo, raramente dos en el lóculo fértil. A diferencia de las otras especies (Boesewinkel y Geenen, 1980), donde se menciona que los tres lóculos pueden desarrollar óvulos, pero después de la fecundación, sólo se observa una semilla por fruto. Rao (1965, citado en Boesewinkel y

Geenen, 1980) menciona que la presencia de dos haces vasculares en la rafe del óvulo, tiene alguna relación con la pérdida de la funcionalidad de dos de los lóculos y con la reducción en el número de óvulos, sin mencionar las bases de esta aseveración. En las raras ocasiones en las que se llegan a desarrollar dos óvulos en el lóculo fértil de *E. havanense*, cada uno de ellos posee dos haces vasculares, mientras que en los lóculos estériles los dos haces vasculares forman parte del pericarpio.

En *E. havanense*, al igual que en *E. coca* (Boesewinkel y Geenen, 1980), se observa la presencia de un obturador en el tegumento interno cercano al micrópilo. El obturador no se ha encontrado en las otras especies de *Erythroxyllum* (Narayana, 1960, 1964, 1970; Davis, 1966; Corner, 1976). La ausencia de obturador y la exina uniforme en miembros de la familia Erythroxylaceae, fueron dos de los caracteres embriológicos que se usaron para separarla de la familia Linaceae (Narayana, 1970). Sin embargo, el obturador está presente en al menos dos miembros de Erythroxylaceae, y además, en el caso de *E. havanense*, se demuestra que la ornamentación de la exina del polen es diferente en ambos morfos florales. Dado lo anterior, no se considera válido que estas estructuras se utilicen como argumento para separar ambas familias. Sin embargo, cualquiera de las clasificaciones coinciden en aceptar la relación estrecha con la familia Linaceae (Cronquist, 1981), debido a que embriológicamente comparten las características de: estructura y desarrollo de la antera, el gametofito masculino, el óvulo, el saco embrionario, el endospermo y el embrión.

Al comparar el desarrollo de las estructuras reproductoras del morfo pin con respecto al morfo thrum en *E. havanense*, se observó que no hay diferencias en cuanto al patrón de desarrollo del gineceo. El número de óvulos formados por frutos es similar, por lo que la diferencia en la producción de frutos en cada uno de los morfos florales (Dominguez, 1990; Ávila, 1991) parece obedecer a las anomalías encontradas durante el desarrollo del androceo en el morfo thrum. Además se detectaron diferencias en la morfología del polen.

El heteromorfismo del polen se define como la producción de diversos tipos de polen, algunas veces con diferencias en la fertilidad (Till-Bottraud *et al.*, 1995) y es clásico de especies heterostilicas. Las diferencias más frecuentes se encuentran en el número de granos de polen por flor, el tamaño (Ganders, 1979b; Richards y Barrett, 1992) y menos frecuentemente en la forma, el color o en la escultura de la exina (Vuilleumier, 1967; Ganders, 1979b; Chapman, 1987; Lloyd y Webb, 1992a). Dulberger (1974)

menciona que el heteromorfismo del polen se ha reportado en 50 de 55 géneros heterostilicos examinados. El tamaño del polen puede diferir entre los distintos verticilos de estambres presentes en una misma flor, como sucede en *E. cocc* (Ganders, 1979a), donde los granos de polen del morfo thrum son más grandes que los de pin (Ganders, 1979b), muchas veces estas diferencias se deben al número de aberturas (Dulberger, 1992). En *E. havanense* el número de aberturas es siempre constante (tres colpos y tres poros en cada grano de polen) y no existen diferencias intermorfo en cuanto al tamaño.

Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias en la coloración de la exina del polen de *E. havanense* como se ha observado en algunas especies de *Linum* (Rogers, 1979; Richards y Barrett, 1992). En contraste, la ornamentación del polen difirió entre los morfos, tal como se encontró en otros géneros como *Rudgea*, (Rubiaceae; Baker, 1956), *Linum* (Linaceae; Rogers, 1979; Dulberger, 1981), *Lithospermum* (Boraginaceae; Weller, 1980) y en varias especies de la familia Plumbaginaceae (Weber-El Ghobary, 1986). Estas observaciones difieren de las descritas por Palacios-Chávez *et al.* (1986), quienes estudiaron la misma población de *E. havanense*. Ellos describieron solamente las exinas reticuladas, como en otras especies del género (Erdtman, 1966). Lo anterior podría deberse a que Palacios-Chávez *et al.* (1986) sólo estudiaron el morfo pin que presenta la exina reticulada. Sin embargo, cabe señalar que en algunas flores thrum también se encontraron granos de polen con ornamentación reticulada, pero como estas observaciones se realizaron en flores abiertas, no se descarta la posibilidad de que haya habido contaminación.

A pesar de haber observado ambas exinas reticuladas y verrugadas en el morfo thrum, es posible que este último patrón de la exina esté relacionado con un problema en la producción de la calosa, ya que ésta funciona como un molde para la depositación de la exina (Vijayaraghavan y Shukla, 1977; Takahashi, 1993). Este estudio es el único que menciona una diferencia en el patrón de la exina en una especie del género *Erythroxylum*, ya que todas las demás investigaciones describen únicamente exinas reticuladas para ambos morfos. Aunque nuestra descripción se basó en repetidas observaciones de granos de polen, obtenidos del interior de las anteras a punto de dehiscencia de los dos morfos por separado, así como en preparaciones permanentes de granos de polen en diferentes etapas del desarrollo, de diversos individuos pin y thrum, las diferencias en la escultura de la exina entre los granos de polen son difíciles de explicar. Existen pocos antecedentes en la literatura que hayan intentado evaluar estas diferencias entre

especies. Dulberger (1992) y Ganders (1979b) proponen que estas diferencias o están relacionadas con la capacidad de los granos de polen para adherirse a diferentes partes de los polinizadores; o bien, con la capacidad para adherirse a los estigmas de los morfos.

Hay marcadas diferencias en el desarrollo del androceo entre los morfos florales de *E. havanense*. El morfo pin presenta un desarrollo normal de las estructuras reproductoras masculinas, mientras que en el morfo thrum se detectó un alto número de flores con anomalías en el desarrollo de las anteras.

En otros sistemas estudiados las anomalías en la parte masculina pueden tener diferentes manifestaciones como: A) la ausencia de estambres o anteras (Chaudhury, 1992, citado en Chaudhury, 1993); B) problemas en la microsporogénesis tanto a nivel premeiótico, meiótico (se detiene el desarrollo de las microsporas) o postmeiótico (Aarts *et al.*, 1993); C) mal funcionamiento del polen al carecer de trífina, un complejo lipídico y proteico que recubre a la exina y que interviene en el reconocimiento entre el polen y el estigma (Preuss *et al.*, 1993), D) la carencia de flavonoides que promuevan la germinación del polen, como sucede en *Zea mays* (Coe *et al.*, 1981) o en *Petunia* (Taylor y Jorgensen, 1992) y finalmente, E) problemas en las anteras para liberar el polen, ya que puede suceder que no haya ruptura del estomio para la dehiscencia (Dawson *et al.*, 1993, citado en Chaudhury, 1993). En resumen, las anomalías durante el desarrollo del polen pueden ocurrir desde la organogénesis de la flor hasta el grano de polen maduro (Shivanna y Johri, 1985; Conley *et al.*, 1994).

Uno de los tejidos que puede estar directamente involucrado en las anomalías del polen es el tapete, que es la capa más interna de la pared de la antera y una fuente de nutrientes y de sustancias de regulación para las células madres de las microsporas y de las sustancias precursoras de la exina del polen (Zhan *et al.*, 1996). Además es el tejido responsable para la síntesis de la calasa, la enzima que degrada la calosa, por lo que cualquier funcionamiento anormal de este tejido repercute directamente en el desarrollo de los granos de polen (Homer y Roger, 1974).

En *E. havanense* las diversas anomalías se detectaron en diferentes etapas del desarrollo del androceo. Se presentaron en el 67% de las flores thrum analizadas (N=70, Domínguez *et al.*, en prensa) básicamente en tres niveles: el tejido esporógeno (esporofito), en el tapete (esporofítico) y en los granos de polen (gametofítico):

1) A nivel de tejido esporógeno la esterilidad que se manifiesta en *E. havanense* se debe a una falla premeiótica o meiótica, provocando que el tejido esporógeno se colapse, dando como consecuencia que las anteras no produzcan granos de polen y se atrofién. Este suceso ha sido también observado en mutantes estériles de tomate, maíz (citas en Chaudhury, 1993) y *Petunia parodii* y *P. hybrida* (Conley *et al.*, 1994). Durante la meiosis de las células madres de las microsporas de *E. havanense*, se detectaron un número considerable de anomalías que pueden deberse a un mal funcionamiento de este tejido. Al parecer las células madres de las microsporas entran a meiosis sin concluir, ya que en los lóculos estériles se observaron estructuras semejantes a tétradas. Estas tétradas anormales son pequeñas, con el citoplasma colapsado y no presentan una pared de calosa que las rodee aunque se observan unidas. Posiblemente la meiosis se adelanta en los lóculos de *E. havanense* sin culminar normalmente, mientras que en los lóculos fértiles donde aún no concluye la meiosis, se observan diadas o cuatro microsporas jóvenes rodeadas aún de calosa. Las microsporas de *E. havanense* pueden permanecer también unidas por puentes citoplásmicos, pero la pared exina es muy delgada, como sucede en *Sorghum bicolor* (Overman y Warmke, 1972).

2) Anomalías del tapete: la ausencia de tapete o la atrofia de éste, manifestada como un crecimiento exagerado y presencia de un gran número de vacuolas en las células tapetales de algunos lóculos estériles de *E. havanense*, parece estar relacionada con la vacuolización de las microsporas en las tétradas y con la carencia de calosa a su alrededor. En otras especies como *Beta vulgaris*, la ausencia de tapete en las anteras, provoca la carencia de la intina y la exina en las microsporas al final de la meiosis, al parecer, las células madres de las microsporas, al inicio de la meiosis presentan numerosas vesículas, ausentes en las líneas fértiles (Hallén *et al.*, 1991). Esto mismo sucede en *E. havanense*.

En algunas líneas estériles de tabaco se detectó que las células del tapete se hipertrofian, siendo de mayor tamaño que las células normales y alargándose hacia el lóculo, haciendo presión sobre las microsporas, lo cual provoca que se liberen tempranamente de la pared de calosa y estallen debido a la exina aún no completamente formada (Steigleitz, 1977; Cerceau-Larrival *et al.*, 1982; Chapman, 1987; Worral *et al.*, 1992; Chasan, 1992). Algo similar puede ocurrir en *E. havanense*. Al parecer, la formación de una exina delgada, que carezca de los estratos más externos (por ejemplo el tectum) provoca que bajo la presión de las células tapetales hipertrofiadas, las

microsporas sean liberadas en un ambiente locular hipotónico, con baja presión osmótica, causada por la ausencia de calosa ya disuelta, provocando la ruptura de la pared celular del polen, sobre todo en las zonas más débiles como las aberturas, trayendo como consecuencia la protrusión citoplásmica como sucede en *Pergularia daemia* (Vijayaraghavan y Shukla, 1977) y tabaco (Worral *et al.*, 1992) y que no se descarta sea la causante de los citoplasmas fuera de los límites de la exina, observados en los granos de polen de *E. havanense*, y que son semejantes a las de los granos de polen de *Vicia faba*, donde también se asocia con la ausencia de tapete (Cerceau-Larrival *et al.*, 1982).

3) A nivel de granos de polen, las anomalías en el morfo thrum de *E. havanense* se presentan en diferentes etapas del desarrollo: A) Algunas microsporas unicelulares permanecen unidas de dos en dos formando díadas pero compartiendo un mismo citoplasma, como se ha observado en plantas estériles de frijol (Johns *et al.*, 1992) o de *Arabidopsis thaliana* (Peirson *et al.*, 1996), o bien B) unidas en másulas; C) granos de polen con citoplasma fuera de los límites impuestos por la exina; D) granos de polen amorfos, pequeños y vacíos sin reservas de almidón; E) anomalías en la pared de la exina y D) diferencias morfológicas en la escultura de la exina entre el polen pin y thrum.

Las diferencias del polen presentadas dentro del morfo thrum de *E. havanense*, inclusive en el interior de un mismo lóculo de la antera, sugiere que esos granos de polen pequeños y mal formados no son viables. La exina no es normal y posiblemente esto determine que no haya reconocimiento en el estigma. Lo anterior puede atribuirse al tapete, ya que parcialmente es el responsable de la síntesis de la exina y también aporta las moléculas de reconocimiento esporofítico hacia el grano de polen (Shivanna y Johni, 1985; Mascarenhas, 1989; 1990; Jardinaud *et al.*, 1993; Greyson, 1994) como el polenkit, la trifina y los flavonoides, requeridos para la germinación del polen en el estigma (Coe *et al.*, 1981; Bhandari, 1984; Taylor y Jorgensen, 1992; Pacini y Franchi, 1993; Hesse, 1993; Preuss *et al.*, 1993; Chaudhury, 1993).

Es también importante reconocer que en *E. havanense*, las anomalías durante el desarrollo y la maduración del polen, no sólo pueden deberse a cuestiones esporofíticas donde participa directamente el tapete. También la célula vegetativa del grano de polen sintetiza las reservas que serán consumidas durante la maduración de éste, la polinización, la germinación y el crecimiento del tubo polínico, por lo que es lógico pensar que el gametofito también podría sufrir alguna alteración, ya que existe una alta proporción de granos de polen en el morfo thrum, sin reservas.

En los granos de polen estériles (vacíos y/o pequeños) del morfo thrum, la capacidad competitiva es pobre al compararla con la de los granos de polen normales del mismo morfo, ya que no contienen reservas de almidón que sean consumidas durante el crecimiento del tubo polínico y por lo tanto, aún cuando logran ser reconocidos en el estigma y pudieran germinar, no es una garantía de que puedan alcanzar los óvulos y llevar a cabo la fecundación. Comparándolos con los del morfo pin resultarían aún menos competitivos, ya que estos últimos tienen un camino más corto que recorrer a través del estilo en las polinizaciones compatibles (Ganders, 1979b), debido a que el morfo thrum presenta un estilo más corto y además una velocidad de crecimiento del tubo polínico mayor, por lo que así se explicaría la doble cantidad de semillas formadas por parte del morfo thrum en los estudios de Domínguez (1990) y Ávila (1991).

Los granos de polen con exina muy delgada, sin aberturas normales, con rompimiento de la exina y protrusión del citoplasma, no podrían ser dispersados de manera eficiente, ya que las condiciones ambientales terminarían con ellos antes de su arribo al estigma. Una exina delgada podría carecer de polenkit, una sustancia producto del tapete y que protege a los granos de polen contra los efectos de la radiación solar, evitando que se dañe el citoplasma de la célula vegetativa y posiblemente amortigua las mutaciones en las células espermáticas y en la célula vegetativa del polen, además de que evita la pérdida excesiva de agua (Pacini y Franchi, 1993). Así mismo, una exina delgada podría carecer de sustancias de reconocimiento como la trífina y los flavonoides (Taylor y Jorgensen, 1992; Chaudhury, 1993; Preuss *et al.*, 1993).

Las anomalías en los granos de polen del morfo thrum podrían estar relacionadas directamente con la diferencia en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos, observada en experimentos de germinación *in vitro* de los granos de polen de *E. havanense* (Ávila, 1991). El morfo thrum presentó una menor proporción de granos de polen germinados, y los que germinaron tuvieron una velocidad de crecimiento del tubo polínico más lenta. En contraste, los granos de polen del morfo pin, mostraron mayor eficiencia en los dos parámetros registrados. Para compensar la mayor distancia que tiene que recorrer un tubo polínico thrum, la velocidad de crecimiento debería ser dos veces más rápida que la de los pin, tal como ocurre en *Primula* (Lewis, 1942, citado en Dulberger, 1992) o en el morfo de estilos largos en las especies tristílicas: *Lythrum salicaria* y *L. junceaum* (citadas en Dulberger, 1992) y más aún si se considera que la oportunidad que tienen los granos de polen para dispersarse, arribar al estigma, ser

reconocidos, germinar y lograr llegar al saco embrionario correspondiente, se limita a un corto tiempo, ya que las flores de *E. havanense* se marchitan el mismo día de la anthesis, siendo receptivas únicamente las primeras horas de la mañana (Domínguez, 1990).

Los resultados de Ávila (1991) son interesantes, ya que él considera que el morfo pin se desempeña como un buen donador de polen. Si además de lo anterior tomamos en cuenta que la distancia que debe recorrer un tubo polínico pin sobre un estilo thrum, es mucho menor que la que debe recorrer un tubo polínico thrum para alcanzar al óvulo a través de un estilo pin, la desventaja para los thrum como donadores de polen se amplifica. Probablemente el bajo porcentaje de germinación, la distancia larga a recorrer en un estilo pin y la lenta velocidad de crecimiento, son otras desventajas más para el polen thrum, que podría repercutir en la formación de un menor número de semillas en el gineceo pin. Esto ayuda a entender por qué el morfo thrum tiene más problemas para una aportación de polen efectiva.

El morfo pin no presenta anomalías en el desarrollo de ninguna de sus estructuras reproductoras, ya que es fértil en su función masculina y femenina, por lo tanto participa en la población como donador de polen y como formador de semillas. Aunque esta última función esté limitada a la poca cantidad de polen viable del morfo thrum. En contraste, el morfo thrum, debido a las anomalías en su función masculina, no es buen donador de polen, porque presenta esterilidad masculina parcial, sin embargo es el morfo que participa con un mayor número de semillas en la población (dos veces más que el morfo pin) como lo demuestran Domínguez (1990) y Ávila (1991). Es claro que este morfo lleva a cabo más eficientemente la función femenina.

La diferencia significativa en la producción de semillas entre los individuos pin y thrum sugiere un proceso de especialización en los morfos florales (Domínguez, 1990; Domínguez y Dirzo, 1995). Se ha sugerido que la diferencia en la producción de semillas entre los morfos de especies heterostilicas, podría ser una consecuencia del flujo asimétrico de polen (Ornduff, 1966; Beach y Bawa, 1980; Chamov, 1984; Casper, 1992). La posibilidad de que las diferencias reproductoras de *E. havanense* se deban al flujo asimétrico de polen entre los morfos florales, se ha descrito anteriormente. Se ha demostrado que los polinizadores no distinguen entre los dos tipos de flor y por lo tanto las visitan con la misma intensidad (Domínguez, 1990; Ávila, 1991; Domínguez y Dirzo, 1995). Así mismo, una serie de experimentos de cruza controladas demostraron que la asimetría reproductora se mantiene bajo un régimen de flujo simétrico de polen

(Dominguez, 1990; Ávila, 1991; Dominguez, *et al.*, en prensa). Estas observaciones no son capaces de explicar las diferencias observadas en la producción de semillas entre los individuos pin y thrum de *E. havanense*. En contraste, el estudio embriológico demostró que las diferencias se deben a que las flores thrum son parcialmente estériles en su función masculina.

En la presente investigación se demuestra que la esterilidad masculina observada en el morfo thrum de *E. havanense*, se debe al desarrollo alterado del tejido esporógeno, del tapete y del gametofito masculino. Existen marcadas semejanzas en el desarrollo de las anteras del morfo thrum, con el de otras especies que presentan esterilidad masculina citoplásmica. En estas especies el tapete juega un papel importante en el desarrollo de los granos de polen viables (Bhandari, 1984; Pacini *et al.*, 1985; Shivanna y Johri, 1985; Chapman, 1987; Suns y Ganders, 1986). Sin embargo, el tapete no es el único responsable de las malformaciones del polen thrum, algunas anomalías se deben también a problemas en el gametofito masculino. Hacen falta estudios más detallados ultraestructurales, moleculares, bioquímicos y genéticos que ayuden a entender lo que está ocurriendo en detalle en *E. havanense*.

La esterilidad masculina del morfo thrum sugiere que este sistema, fenotípicamente heterostílico, se está comportando como un sistema parcialmente ginodioico (presencia de individuos con flores bisexuales e individuos con flores pistiladas en una misma población). El morfo pin funciona como un hermafrodita y el morfo thrum, parcialmente estéril, funciona principalmente como femenino. La importancia de los hallazgos del presente trabajo, radica en que a partir de ellos, se puede proponer que la esterilidad masculina de uno de los morfos, funciona como un nuevo mecanismo para la ruptura de la heterostilia.

Se ha propuesto que la heterostilia puede originar nuevos sistemas reproductores como son: el hermafroditismo (homostilia) y el dioicismo (Omduff, 1966; Opler *et al.*, 1975; Lloyd, 1979; Beach y Bawa, 1980; Muenchow y Grebus, 1989; Barrett, 1990). Sin embargo, esta es la primera investigación en la que se propone que un sistema heterostílico, pueda originar también a un sistema reproductor ginodioico.

En la familia Erythroxylaceae la mayoría de las especies son distílicas (Ganders, 1979a), pero se han encontrado también casos de dioicismo en ocho especies de Las Antillas y Centroamérica (Schulz, 1931), por lo que no puede descartarse también que en esta familia se puedan originar sistemas dioicos a partir de heterostílicos. Sin embargo se

carece de estudios ecológicos y embriológicos que sustenten una discusión sobre este punto.

La ginodioecia es un sistema de reproducción sexual que surge en poblaciones hermafroditas, como consecuencia de un conflicto de intereses genéticos sobre la distribución de recursos asignados al desarrollo del polen y óvulos (Cosmides y Tooby, 1981; Frank, 1989; Saumitou-Laprade *et al.*, 1994; Domínguez, 1995). La distribución de los individuos estériles masculinos (femeninos) entre las poblaciones hermafroditas, refleja la resolución de los conflictos genómicos, ya que la esterilidad masculina citoplásmica debe considerarse como el resultado de la interacción coevolutiva entre genes citoplásmicos y nucleares (Van Damme y Van Delden, 1982; Van Damme, 1983; Saumitou-Laprade *et al.*, 1994). La información genética contenida en el citoplasma y en el núcleo puede influir en el fenotipo y está sometida a selección natural dependiendo de la manera de heredarse, ya sea uniparental o biparental (Saumitou-Laprade *et al.*, 1994). En la mayoría de las especies ginodioicas, la esterilidad masculina involucra al genoma mitocondrial y nuclear (van Damme, 1983).

Si se presentara una mutación en el genoma citoplásmico, principalmente el mitocondrial, fenotípicamente causará esterilidad masculina. Pero si existe un alelo restaurador en el núcleo, se restablecerá la fertilidad en la siguiente generación (Saumitou-Laprade *et al.*, 1994). En *E. havanense* se desconoce aún que tipo de herencia presenta la esterilidad masculina en el morfo thrum y si los alelos restauradores pudieran estar asociados con el supergen de la heterostilia. A pesar de que existen semejanzas entre la esterilidad masculina en *E. havanense* y algunas especies con esterilidad masculina citoplásmica, no se puede afirmar que la esterilidad de *E. havanense* sea citoplásmica. Se requiere aún del conocimiento ultraestructural, genético y molecular para poder afirmar si el sistema reproductor de *E. havanense*, que se está comportando como parcialmente ginodioico, podría convertirse en un sistema completamente ginodioico y posteriormente tender hacia el dioicismo, con una previa pérdida gradual de la fertilidad femenina de los individuos hermafroditas, como lo mencionan Charlesworth y Charlesworth (1978), lo cual apoyaría la primera propuesta de Domínguez (1990) y Ávila (1991) para *E. havanense*.

VI. CONCLUSIONES

La embriología de *E. havanense* es semejante a la de otras especies del género. Las diferencias encontradas radican en la ornamentación de la exina, la presencia de un obturador (aunque hay otra especie que sí lo presenta) y el número de células en el grano de polen maduro.

Al comparar el desarrollo de las estructuras reproductoras de los morfos pin y thrum en *E. havanense*, se detectó una esterilidad masculina parcial en el morfo thrum.

La presencia de la esterilidad masculina parcial en el morfo thrum, explica la asimetría reproductora encontrada en esta especie heterostilica.

Esta especie morfológicamente heterostilica, se comporta como ginodioica parcial.

Las anomalías que presenta durante el desarrollo del polen el morfo thrum en *E. havanense*, son semejantes a las que se presentan en los casos de esterilidad masculina citoplásmica.

Se desconoce si el sistema reproductor, morfológicamente heterostilico de *E. havanense* se encuentra en el inicio de la evolución hacia un sistema reproductor dioico, como lo propusieron en un principio Domínguez (1990) y Ávila (1991), o si se encuentra casi por concluir el establecimiento de un sistema ginodioico.

VII. LITERATURA CONSULTADA

- Aarts, M. G. M., W. G. Dirkse, W. J. Stekema y A. Pereira. 1993. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363: 715-717.
- Abad, A. R., B. J. Mehrtens, y S. A. Mackenzie. 1995. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Plant Cell* 7: 271-285.
- Ávila, S. G. 1991. Efectos maternos y paternos sobre la producción de semillas en el desempeño de la progenie del arbusto heterostilico *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ayala, R., F. Noguera, E. Ramírez y A. Rodríguez. 1993. Boletín informativo de la Estación de Biología Chamela. No. 3. pags. 3-4.
- Baker, H. G. 1956. Pollen dimorphism in the Rubiaceae. *Evolution* 10: 23-31.
- Baker, H. G. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The Plumbaginaceae. *Evolution* 20: 349-368.
- Baker, H. G., e I. Baker. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany* 66: 591-600.
- Barnes, S. H. y S. Blackmore. 1986. Some functional features in pollen development. *En* S. Blackmore e I. K. Ferguson (Eds.). *Pollen and spores: form and function*. Academic Press, London. pp 71-80.
- Barnes, S. H. y S. Blackmore. 1992. Ultrastructural organization of two tapetal types in Angiosperms. *Arch. Histol. Cytol.* 55: 217-224
- Barrett, S. C. H. 1980. Dimorphic incompatibility and gender in *Nymphoides indica* (Menyanthaceae). *Canadian Journal of Botany* 58: 1938-1942.
- Barrett, S. C. H. 1990. The evolution and adaptative significance of heterostyly. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 144-148.
- Barrett, S. C. H., M. T. Morgan y B. C. Husband. 1989. The dissolution of a complex genetic polymorphism: the evolution of self-fertilization in tristilous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution* 43: 1398-1416.
- Bawa, K. S. y J. H. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 254-274.

- Beach, J. H. y K. S. Bawa. 1980. Role of pollinators in evolution of dioecy from distily. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Bedinger, P. A. 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.
- Berry, P. E., H. Tobe y J. A. Gómez. 1991. Agamospermy and the loss of distily in *Erythroxylum undulatum* (Erythroxylaceae) from Northern Venezuela. *American Journal of Botany* 78: 595-600.
- Bhandari, N. N. 1984. The microsporangium. *En* B. M. Johri (Ed.). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin. pp 53-122.
- Blackmore, S., y S. H. Barnes. 1990. Pollen wall development in angiosperms. *En* S. Blackmore y R. B. Knox (Eds.). *Microspores: evolution and ontogeny*. Academic Press, New York. pp 173-192
- Boesewinkel, F. D. y J. Geenen. 1980. Development of ovule and seed-coat of *Erythroxylum coca* Lmk. *Acta Botanica Neerlandica* 29: 23-241.
- Bouman, F. 1984. *En* B. M. Johri (Ed.). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin. pp 123-157.
- Bullock, S. H. 1986. Climate of Chameia, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Archives for Meteorology, Geophysics and Bioclimatology* 36: 279- 316.
- Bullock, S. H. y A. Solís-Magallanes. 1990. Phenology of canopy trees of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 22: 22-35.
- Casper, B. B. 1992. The application of sex-allocation theory to heterostylous plants. *En* S. C. H. Barret (Ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin. pp 209-223.
- Cerceau-Larrival, M. T., J. C. Audran, J. Bouillot y G. Duc. 1982. La stérilité male nucléocytoplasmique chez la Féverole (*Vicia faba* L.). IV- Incidence de ia stérilité male nucléocytoplasmique 447 sur le phénotype du pollen à l'anthèse. *Rev. Cytol. Biol. végét.- Bot.* 5: 95-114.
- Chapman, G. P. 1987. The tapetum. *En* K. L. Giles y J. Prakash (Eds.). *Pollen: cytology and development*. Academic Press, London. pp 111-125. y a
- Charlesworth, B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.
- Charnov, E. L. 1984. Behavioural ecology of plants. *En* J. R. Krebs y N. B. Davies (Eds.). *Behavioural ecology: and evolutionary approach*. Sinauer, Massachusetts. pp 362-379. f
- Chasan, R. 1992. Breaching the callose wall. *Plant Cell* 4: 745-746.
- Chaudhury, A. M. 1993. Nuclear genes controlling male fertility. *Plant Cell* 5: 1277-1283.

- Ciément, C. y J. C. Audran. 1993. Cytochemical and ultrastructural evolution of orbicules in *Linum*. *Plant Systematics and Evolution* (Supplement) 7: 39-52. En M. Hesse, E. Pacini y M. Wilmse (Eds.). *The tapetum, cytology, biochemistry and evolution*. Springer-Verlag, New York.
- Coe, E. H., S. H. McCormick y S. A. Modena. 1981. White pollen in maize. *Journal Heredity* 72: 318-320.
- Conley, C. A., M. V. Parthasarathy y M. R. Hanson. 1994. Effects of *Petunia* cytoplasmic male sterile (CMS) cytoplasm on the development of sterile and fertility-restored *P. parodi* anthers. *American Journal of Botany* 81: 630-640.
- Corner E. J. H. 1976. *The seeds of dicotyledons*. Cambridge University Press, London, 2v. pp 128-129, 177-178.
- Cosmides, L. M. y J. Tooby. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of Theoretical Biology* 89: 83-129.
- Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology. A practical approach*. IRL Press, New York.
- Davis, G. L. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley, New York.
- Dellaporta, S. L. y A. Calderon-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1241-1251.
- Domínguez, C. A. 1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónica y masiva de *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). Tesis Doctoral. Centro de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Domínguez, C. A. 1995. Genetic conflicts of interest in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 412-416.
- Domínguez, C. A. y R. Dirzo. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9: 204-216.
- Domínguez, C. A., G. Ávila-Sakar, S. Vázquez-Santana y J. Márquez-Guzmán. (en prensa). Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany*.
- Dulberger, R. 1974. Structural dimorphism of stigmatic papillae in distylous *Linum* species. *American Journal of Botany* 61: 238-243.
- Dulberger, R. 1981. Dimorphic exine sculpturing in three distylous species of *Linum* (Linaceae). *Plant Systematics and Evolution* 139: 113-119.

- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostyly syndrome. *En* S. C. H. Barrett (Ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, New York. pp 41-84.
- Erdtman, G. 1943. An introduction to pollen analysis. The Ronald Press Co., New York.
- Erdtman G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. Hafner, New York.
- Fitzgerald, M. A., D. M. Calder y R. B. Knox. 1993. Secretory events in the freeze-substituted tapetum of the orchid *Pterostylis concinna*. *Plant Systematics and Evolution* (Supplement) 7: 53-62. *En* M. Hesse, E. Pacini y M. Willemse (Eds.). *The tapetum, cytology, biochemistry and evolution*. Springer-Verlag, New York
- Fosket, D. E. 1994. *Plant growth and development: a molecular approach*. Academic press, New York.
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male-sterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Ganders, F. R. 1979a. Heterostyly in *Erythroxyllum coca* (Erythroxyllaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 78: 1-20.
- Ganders, F. R. 1979b. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635
- Golberg, R. B., T. P. Beals y P.M. Sanders. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- Greyson, R. I. 1994. *The development of flowers*. Oxford University Press, New York.
- Gryj, R. E. O. 1990. *Dispersión de frutos del arbusto Erythroxyllum havanense Jacq. en Chameña, Jalisco*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Halldén, C., G. Karlsson, C. Lind, I. M. Moller y W. K. Heneen. 1991. Microsporogenesis and tapetal development in fertile and cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sexual Plant Reproduction* 4: 215-225.
- Hesse, M. 1993. Pollenkitt development and composition in *Tilia platyphyllos* (Tiliaceae) analysed by conventional and energy filtering TEM. *Plant Systematics and Evolution* (Supplement) 7: 39-52. *En* M. Hesse, E. Pacini y M. Willemse (Eds.). *The tapetum, cytology, biochemistry and evolution*. Springer-Verlag, New York.
- Hesse, M. y M. Hess. 1993. Recent trends in tapetum research. A cytological and methodological review. *Plant Systematics and Evolution* (Supplement) 7: 127-145. *En* M. Hesse, E. Pacini y M. Willemse (Eds.). *The tapetum, cytology, biochemistry and evolution*. Springer-Verlag, New York.

- Horner, H. T. y M. A. Rogers. 1974. A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male sterile pepper (*Capsicum annuum*). *Canadian Journal of Botany* 52: 435-441.
- Izhar, S. y R. Frankel. 1971. Mechanism of male sterility in *Petunia*: the relationship between pH, callase activity in the anthers, and the breakdown of the microsporogenesis. *Theoretical and Applied Genetics* 44: 104-108.
- Jardinaud, M.-F., A. Souvré y G. Alibert. 1993. Nuclease activities in *Tradescantia paludosa* and *Brassica napus* pollen and tapetum. *Plant Systematics and Evolution* (Supplement) 7: 91-97. *En* M. Hesse, E. Pacini y M. Willemse (Eds.). *The tapetum, cytology, biochemistry and evolution*. Springer-Verlag, New York.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- Johns, C., M. Lu, A. Lyznik y S. Mackenzie. 1992. A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants. *Plant Cell* 4: 435-449.
- Laser, K. D. y N. R. Lersten. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male-sterile angiosperms. *The Botanical Review* 38: 425-454.
- Lewis, D. y D. A. Jones. 1992. The genetics of heterostyly. *En* S. C. H. Barrett (Ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, New York. pp 129-150.
- Lloyd, D. G. 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematics and Evolution* 131: 71-80.
- Lloyd, D. G. y C. J. Webb. 1992a. The evolution of heterostyly. *En* S. C. H. Barrett (Ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, New York. pp 151-178.
- Lloyd, D. G. y C. J. Webb. 1992b. The selection of heterostyly. *En* S. C. H. Barrett (Ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, New York. pp 179-207.
- Lott, E. J. 1985. Listados florísticos de México III. La Estación de Biología Chamela Jalisco. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lott, E. J., S. H. Bullock y J. A. Solís-Magallanes. 1987. Floristic diversity and structure of upland and arroyo forests of Coastal Jalisco. *Biotropica* 19: 228-235.
- Maheshwari, P. 1950. *An introduction to the embryology of angiosperms*. McGraw-Hill, New York.
- Mariani, P., M. Lucchi, F. Guzzo, S. Varotto y P. Parrini. 1991. Cytological evidence of a new male-sterile mutant in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Sexual Plant Reproduction* 4: 197-202.

- Mascarenhas, J. P. 1989. The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* 1: 657-664.
- Mascarenhas, J. P. 1990. Gene activity during development. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 4: 317-338.
- McCormick, S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- Muenchow, G. E. y M. Grebus. 1989. The evolution of dioecy from distyly: reevaluation of the hypothesis of the loss of long-tongued pollinators. *American Naturalist* 133: 149-156.
- Narayana, L. L. 1960. Studies in Erythroxylaceae I. *Proceedings Indian Academic Science* 51: 270-275.
- Narayana, L. L. 1964. Embryology of a few species of *Erythroxylum*. *Current Science* 33: 441-442.
- Narayana, L.L. 1970. Erythroxylaceae. *En Symposium on comparative embryology of angiosperms*, Delhi. *Bulletin of the Indian Natural Science Academy* 41: 133-135.
- Opler, P. A., H. G. Baker y G. W. Frankie. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* 7: 234-247.
- Ornduff, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Evolution* 20: 309-314.
- Overman, M. A. y H. E. Warmke. 1972. Cytoplasmic male sterility in sorghum. II. Tapetal behaviour in fertile and sterile anthers. *Journal Heredity* 63: 227-234.
- Pacini, E. 1990. Tapetum and microspore function. *En S. Blackmore y R. B. Knox* (Eds.). *Microspores: evolution and ontogeny*. Academic Press, London. pp 213-237.
- Pacini, E. y G. G. Franchi. 1991. Diversification and evolution of the tapetum. *En S. Blackmore y S. H. Barnes* (Eds.). *Pollen and spores: patterns of diversification*. Clarendon Press, Oxford. pp. 301-316.
- Pacini, E. y G. G. Franchi. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Systematics and Evolution* (Supplement) 7: 1-11. *En M. Hesse, E. Pacini y M. Willems* (Eds.). *The tapetum, cytology, biochemistry and evolution*. Springer-Verlag, New York.
- Pacini, E., G. G. Franchi y M. Hesse. 1985. The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics and Evolution* 149: 155-185.
- Palacios-Chávez, R., M. de la L. Arreguín-Sánchez, D. L. Quiroz-García y D. Ramos-Zamora. 1986. Morfología de los granos de polen del género *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) de Chamela, Jalisco. *Phytologia* 61: 150-157.

Peirson, B. N., H. A. Owen, K. A. Feldmann y C. A. Makaroff. 1996. Characterization of three male-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibiting alterations in meiosis. *Sexual Plant Reproduction* 9: 35-43.

Preuss, D., B. Lemieux, G. Yen y R. W. Davis. 1993. A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signalling during fertilization. *Genes Development* 7: 974-985.

Raven, P. H., R. F. Evert y S. E. Eichhorn. 1992. *Biology of Plants*. Worth Publishers, New York.

Reiser, L. y R. L. Fisher. 1993. The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5: 1291-1301.

Richards, J. H. y S. C. H. Barrett. 1992. The development of heterostyly. *En S. C. H. Barrett (Ed.). Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, New York. pp 85-127.

Rogers, C. M. 1979. Distyly and pollen dimorphism in *Linum suffruticosum* (Linaceae). *Plant Systematics and Evolution* 131: 127-132.

Rzedowski, J. 1978. *La vegetación de México*. Limusa, México.

Saumitou-Laprade, P., J. Cuguen, y P. Vernet. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 431-435.

Schulz, O. E. 1931. Erythroxylaceae. *En A. Engler y K. Prantl (Eds.). Die natürlichen Pflanzenfamilien*. 2. Aufl. Bd. 19a: 130-143.

Shivanna, K. R. y B. M. Johri. 1985. *The angiosperm pollen. Structure and function*. Wiley Eastern Limited, New Delhi.

Sobrevilla, C., N. Ramírez y N. Xena de Enrech. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolaris* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica* 15: 161-169.

Standley, P. C. 1923. Trees and shrubs of Mexico. *Contributions for the United States National Herbarium* 23: 517-848.

Steiglitz, H. 1977. Role of β -1,3-glucanase in postmeiotic microspore release. *Development Biology* 57: 87-97.

Suns, M. y F. R. Ganders. 1986. Female frequencies in gynodioecious populations correlated with selfing rates in hermaphrodites. *American Journal of Botany* 73: 1645-1648.

Takahasi, M. 1993. Exine initiation and substructure in pollen of *Caesalpinia japonica* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *American Journal of Botany* 80: 192-197.

- Taylor, L. P. y R. Jorgensen. 1992. Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia. *Journal Heredity* 83: 11-17.
- Till-Bottraud, I., A. Mignot, R. De Paepe e I. Dajoz. 1995. Pollen heteromorphism in *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 82: 1040-1048.
- Valley P. 1976. JB-4 embedding kit. Polysciences Inc. Warrington. Printed in U.S.A. 3 pp.
- Van Damme, J. M. M. 1983. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50: 253-273.
- Van Damme, J. M. M. y W. Van Delden. 1982. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. I. Polymorphism for plasmon type. *Heredity* 49: 303-318.
- Vijayaraghavan, M. R. y A. K. Shukla. 1977. Absence of callose around the microspore tetrad and poorly developed exine in *Pergularia daemia*. *Annals of Botany* 41: 923-926.
- Vuilleumier, B. S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* 21: 210-226.
- Warmke, H. E. y S. -L. J. Lee. 1977. Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. *Journal Heredity* 68: 213-22.
- Weber-Ei Ghobary, M. O. 1986. Dimorphic exine sculpturing in two distylous species of *Dycrophytum* (Plumbaginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 152: 267-276.
- Weiler, S. G. 1980. Pollen Flow and fecundity in populations of *Lithospermum carolinense*. *American Journal of Botany* 67: 1334-1341.
- Willson, M. F. 1990. Sexual selection in plants and animals. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 210-214.
- Worrall, D., D. L. Hird, R. Hodge, W. Paul, J. Draper y R. Scott. 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4: 759-771.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plants interactions and the evolution of breeding systems. *En L. Real.* (Ed.). *Pollination Biology*. Academic Press, New York.
- Zhan, X., H. Wu y A. Y. Cheung. 1996. Nuclear male sterility induced by pollen-specific expression of a ribonuclease. *Sexual Plant Reproduction* 9: 35-43.