

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudios embriológicos en girasol (*Helianthus annuus* L.)
bajo condiciones ambientales normales y de estrés hídrico

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Marina María Gotelli

Directores de tesis: Dra. Beatriz Galati
 Dr. Diego Medan

Consejero de Estudios: Dra. Patricia Hoc

Lugar de trabajo: Cátedra de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2008

Resumen

Estudios embriológicos en girasol (*Helianthus annuus* L.) bajo condiciones ambientales normales y de estrés hídrico

Se realizó un estudio comparativo de la embriología del girasol en tres híbridos comerciales, DK 4050, CF 17 y P 30, y una línea endocriada, HA 89. El objetivo principal de este trabajo fue buscar las causas de las fallas de fructificación que ocurren en flores del capítulo de girasol, con consiguientes mermas en el rendimiento de este cultivo. El estudio del desarrollo del grano de polen permitió detectar por primera vez la presencia de una membrana peritapetal con orbículas, proveniente de un tapete plasmodial. El saco embrionario joven consiste en seis células y siete u ocho núcleos. Los megagametófitos poseen hasta cuatro antípodas, las que poseen un número variable de núcleos, y pueden presentar paredes bien definidas entre ellas. No se encontraron diferencias embriológicas entre las flores de distintos sectores del capítulo, pero las discrepancias observadas entre los distintos genotipos podrían justificar las inconsistencias entre las investigaciones previas. El aborto de algunos frutos del capítulo no puede ser atribuido a anormalidades durante el desarrollo del gametófito femenino, ya que no hay indicios de que los megagametófitos descriptos no puedan ser normalmente fecundados para formar semillas viables.

La fertilización se produce una hora después de la polinización. Los tubos polínicos crecen a través del tejido de transmisión del estilo y del óvulo. En la micrópila del óvulo el tejido transmisor es recién reconocible, con microscopía óptica, veinte

minutos antes de la llegada del tubo polínico al megagametófito. El embrión bicelular se observa 16 horas después de la fertilización, y alcanza su madurez aproximadamente tres días después.

La identidad del dador de polen no tuvo ningún efecto sobre el curso normal del desarrollo embrionario. Sin embargo, en el híbrido comercial P 30 autofecundado, se encontraron embriones con cotiledones poco desarrollados, los cuales se compararon con los normales empleando microscopía electrónica de transmisión, lo que permitió corroborar la ausencia de sustancias de reserva en los primeros.

Hasta el momento nada se sabía acerca del efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo embriológico del girasol. En este trabajo se sometieron plantas del híbrido DK 4050 a pulsos de 4-6 días de estrés hídrico en seis estadios distintos del desarrollo del capítulo [entre los estadios R2 y R9 de la barra de desarrollo de Schneiter & Miller (1981)]. Utilizando técnicas histológicas se estudiaron los cambios post-estrés producidos durante la megasporogénesis y megagametogénesis en flores del centro, medio y periferia de la inflorescencia, en comparación con un grupo control de plantas no estresadas. Los procesos de microsporogénesis y microgametogénesis, que ocurren antes del estadio R2, no fueron afectados por el experimento. Aunque el estrés hídrico tuvo poco efecto en los estadios más jóvenes (R2-R3), se observaron algunas irregularidades. La falta de agua retrasó el desarrollo de las flores centrales cuando fueron estresadas en R6 (flores periféricas con los estigmas expuestos), pero no afectó sustancialmente su desarrollo posterior. La mayoría de las anormalidades aparecieron en plantas estresadas durante o después de la fertilización (R7-R9), que consecuentemente

tuvieron los valores más bajos en la tasa de fructificación. Aunque los megagametófitos presentaron una gran variabilidad entre tratamientos y dentro de éstos, todos aquellos que desarrollaron o se esperaba que desarrollaran embriones viables tenían dos antípodas con numerosos núcleos y paredes rotundas entre ellas y la célula media.

El presente trabajo mejoró la comprensión del desarrollo embriológico normal del girasol, a través de una apreciación más completa de la variabilidad presente en algunos aspectos del proceso, y del aporte de información nueva sobre otros. Además permitió identificar anomalías embriológicas generadas como respuesta al estrés hídrico, consistentemente asociadas a fallas en la formación de frutos, proveyendo así un enlace causal entre la sequía y la disminución del rendimiento en este cultivo

Palabras claves: *Helianthus annuus* L., girasol, embriología, megagametófito, embrión, microgametófito.

Abstract

Embryological studies on sunflower (*Helianthus annuus* L.) under normal environmental conditions and under water stress

A comparative embryological study was made of three commercial sunflower hybrids, DK 4050, CF 17 and P 30, and an inbred line, HA 89. The aim of this investigation was to search for causes of fructification failure, and consequently yield losses, occurring in this crop. The study of pollen grain development allowed the detection, for the first time in this species, of a peritapetal membrane with orbicules, derived from a plasmoidal tapetum. The young embryo-sac consists of six cells and seven or eight nuclei. Megagametophytes present up to four antipodals with a variable number of nuclei each. Thick walls were observed in some of these cells. There were no differences among flowers located at different positions in the inflorescence. However, differences between genotypes could explain inconsistencies found on previous published reports. Fruit abortion cannot be adjudicated to abnormalities during the development of the female gametophyte since it seems that all megagametophytes variants described could be normally fertilized and could, therefore, develop viable embryos.

Fertilization occurs one hour after pollination. Pollen tubes grow through the transmitting tissue of the style and ovule. In the micropyle the transmitting tissue is first recognizable, with optic microscopy, twenty minutes before the pollen tube arrival to the megagametophyte. A bicellular pro-embryo is seen 16 hours after pollination and the

mature embryo is found approximately three days later.

The identity of the pollen donor had no effect on the normal course of embryo development. However, in some self-pollinated flowers of P 30, embryos with underdeveloped cotyledons were found. These were compared with normal embryos using transmission electron microscopy. The former does not accumulate reserve substances.

There is no data on the effects of water stress on sunflower embryology. We submitted plants of the hybrid DK 4050 to 4-6 day pulses of water stress at six different periods of capitulum development [located within stages R2-R9 of Schneiter & Miller's (1981) developmental scale]. Using histological techniques, we studied post-stress changes in megasporogenesis and megagametogenesis, as compared to unstressed control plants, in central, mid and peripheral flowers of the head. Fate of embryos and rates of grain filling were also monitored. Microsporogenesis and microgametogenesis were unaffected because these processes were completed before inception of the stress treatments. Although water stress had little effect at stages R2-R3, some irregularities were observed. Water stress retarded the development of central flowers when stressed during R6 (peripheral flowers with their stigmas exposed), but did not affect their future development. Most abnormalities appeared in plants stressed during or after fertilization (R7-R9), which concurrently showed the lowest values of grain filling. Although megagametophytes varied considerably, both within and between treatments, all female gametophytes that did develop, or were expected to develop viable embryos had only two antipodes with numerous nuclei and thick walls separating them from each other

and from the central cell.

This work improved the understanding of the normal embryological development in sunflower, both through a more complete assessment of the variability inherent to some aspects of the process, and the addition of novel data on other aspects. Moreover, it allowed to identify embryological abnormalities appeared as a consequence of water stress, which are consistently associated to failure of fruit formation, thus establishing a causal link between drought and yield decrease in this crop.

Key words: *Helianthus annuus* L., sunflower, embryology, megagametophyte, embryo, microgametophyte.

INDICE

Capítulo I: Introducción general

1.1. La especie	13
1.2. El cultivo	15
1.3. Antecedentes embriológicos sobre girasol	18
1.4. Planteo del problema	19
1.5. Objetivos generales	20
1.6. Objetivos particulares	21

Capítulo II: Materiales y métodos

2.1. Materiales utilizados	23
2.2. Preparación del material para microscopía óptica	23
2.3. Preparación del material para microscopía electrónica	24
2.3.1. Microscopio electrónico de barrido (MEB)	24
2.3.2. Microscopio electrónico de transmisión (MET)	25
2.4. Efecto de la identidad del dador de polen	25
2.5. Efecto del estrés hídrico	26

Capítulo III: Microsporangio, microsporogénesis y microgametogénesis

3.1. Introducción	30
3.2. Resultados	31

3.2.1. Microsporangio	31
3.2.2. Microsporogénesis y microgametogénesis	33
3.2.3. Morfología del grano de polen	34
3.3. Discusión	35

Capítulo IV: Gineceo, óvulo, megasporogenesis y megagametogenesis

4.1. Introducción	45
4.2. Resultados	45
4.2.1. Gineceo	45
4.2.2. Ovulo	46
4.2.3. Megasporogénesis y megagametogénesis	47
4.2.3.1. HA 89	48
4.2.3.2. P30 y CF 17	49
4.2.3.3. DK4050	51
4.3. Discusión	53

Capítulo V: Estilo y estigma

5.1. Introducción	68
5.2. Resultados	73
5.2.1. Estigma y y estilo	74
5.2.3. Tejido de transmisión en el óvulo	76
5.3. Discusión	77

Capítulo VI: Fertilización y endospermogénesis

6.1. Introducción	92
6.2. Resultados	94
6.2.1. Fertilización	94
6.2.2. Desarrollo del endosperma	95
6.2.3. Células del tapete tegumentario	96
6.3. Discusión	97

Capítulo VII: Embriogénesis y desarrollo del pericarpo

7.1. Introducción	113
7.2. Resultados	114
7.2.1. Desarrollo del embrión	114
7.2.2. Cruzamiento entre híbridos	115
7.2.3. Ultraestructura de los distintos embriones	116
7.2.4. Desarrollo del pericarpo	116
7.3. Discusión	118

Capítulo VIII: Efecto del estrés hídrico en la embriología del híbrido comercial

DK 4050

8.1. Introducción	136
8.2. Resultados	138
8.2.1. Microsporogénesis y microgametogénesis	139

8.2.2. Megasporogénesis y megagametogénesis	139
8.2.3. Fertilización y desarrollo del embrión	143
8.2.4. Efecto del estrés hídrico en el rendimiento	144
8.3. Discusión	145
Capítulo IX: Conclusiones generales	168
Capítulo X: Referencias	178

CAPITULO I

Introducción



1.1. La especie.

El género *Helianthus* pertenece a la familia Asteraceae e incluye especies diploides, tetraploides y hexaploides con número cromosómico básico $x = 17$ (Heiser, 1978). Su centro de origen se encuentra en América del Norte, donde crecen unas 50 especies anuales y perennes, adaptadas a diversos hábitat y altamente diversas en cuanto a caracteres morfológicos y fisiológicos. Seiler y Rieseberg (1997) dividieron al género en cuatro secciones, *Ciliares*, *Atrorubens*, *Agrestes* y *Helianthus*. Esta última incluye 13 especies anuales y diploides, la mayor parte adaptadas a hábitat de secos a extremadamente secos, y a suelos arenosos. Dos especies de la sección *Helianthus* han sido descriptas como adventicias en la República Argentina, *Helianthus annuus* L. y *H. petiolaris* Nutt. (Cabrera, 1963; Covas, 1966). Cabrera (1974) menciona a *H. petiolaris* como en vías de naturalización y a *H. annuus* como frecuentemente sub-espontánea, pero nunca naturalizada. González Roelants *et al.* (1997) describieron la distribución de estas especies en las provincias de La Pampa y Buenos Aires. Actualmente, ambas se citan como naturalizadas en las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Entre Ríos (Zuloaga y Morrone, 1999). Probablemente ambas fueron introducidas accidentalmente, como impurezas en lotes de semilla de especies forrajeras (Poverene *et al.*, 2000).

El girasol, *Helianthus annuus* L., comprende tres subespecies principales: *H. annuus* ssp. *lenticularis* (Dougl. ex Lindl.) Cockerell, girasol silvestre; *H. annuus* ssp. *annuus*, girasol maleza; y, *H. annuus* ssp. *macrocarpus* (DC.) Cockerell, girasol cultivado. El girasol silvestre se encuentra en el oeste de América del Norte, es de vástago ramificado, con capítulos y aquenios pequeños y pocas flores liguladas. El

girasol maleza crece en el Medio Oeste de los Estados Unidos, es también ramificado, pero los capítulos y aquenios son de mayor tamaño y tiene mayor número de flores liguladas. El girasol cultivado no es ramificado, posee un solo capítulo con numerosas flores liguladas y aquenios grandes. Está distribuido en casi todo el mundo pero no persiste fuera del cultivo. Es una de las pocas plantas que han sido domesticadas en la zona templada de América del Norte y cuyo antecesor silvestre es conocido con precisión (Heiser, 1954).

El girasol presenta discordancia morfo-fisiológica de maduración de estambres y pistilos (protandria) y un sistema genético de autoincompatibilidad esporofítico, frecuente en la familia de las compuestas. De acuerdo con Habura (1957), el sistema esporofítico de autoincompatibilidad en el girasol cultivado está controlado por dos genes multialélicos cuya expresión es influenciada por factores fisiológicos. Fernández-Martínez y Knowles (1978) estudiaron el fenómeno en especies silvestres y encontraron que la autoincompatibilidad se determina esporofíticamente y que están involucrados cinco alelos S diferentes. El sistema de autoincompatibilidad en girasol está poco desarrollado y sirve más para disminuir que para impedir la fecundación. El porcentaje de autocompatibilidad de líneas oscila entre 5 y 95 % (promedio = 56 %) y de híbridos entre el 15 y el 95 % (promedio = 68 %). En cuanto a los aspectos fisiológicos, Vranceanu *et al.* (1977) establecen que las altas temperaturas, superando los 35ºC, y los períodos lumínicos cortos actúan negativamente sobre la autocompatibilidad. Se encontró que el polen germina en el estigma y que el crecimiento del tubo polínico se detiene en la superficie del mismo, durante la polinización con el mismo polen. La calosa tapa las paredes del grano de polen, del tubo polínico y de las papilas

estigmáticas en el sitio de contacto con éstos. También se ha formulado la hipótesis de la presencia de sustancias inhibidoras e incluso de tipo hormonal.

1.2. El cultivo

Argentina es uno de los principales productores mundiales de girasol. Se siembran híbridos comerciales entre los 24 y 38 grados de longitud sur (desde Chaco hasta el sur de la provincia de Buenos Aires) abarcando una amplia gama de ambientes. En esta extensa región el girasol constituye una importante alternativa para los productores agropecuarios (Mutti y Dosio, 2003). Los híbridos se obtuvieron artificialmente a través de programas de mejoramiento, que han permitido aumentar el rendimiento y disminuir la autoincompatibilidad presente originalmente en los antecesores silvestres del girasol. El descubrimiento de la androesterilidad genética en 1968 y de la androesterilidad citoplásmica en 1970, hicieron posible la producción y difusión de los primeros híbridos en barra comercial.

El rendimiento del cultivo varía en función de varios factores. Cantagallo *et al.* (1997) sugieren que hay una reducción de aproximadamente el 32% en el rendimiento del cultivo por cada 10° de latitud. Además los rendimientos decrecen gradualmente con el atraso de la fecha de siembra. La reducción en el número potencial de frutos en girasol fluctúa de 6 % a 10% por cada mes de retraso (Cantagallo *et al.*, 1997).

El tiempo necesario para el desarrollo de la planta de girasol, al igual que el tiempo entre estadios de desarrollo es afectado por los antecedentes genéticos del cultivar, el fotoperíodo, la temperatura, la humedad de suelo y su fertilidad. Robinson (1971) y Siddiqui *et al.* (1975) desarrollaron dos métodos para describir los estadios vegetativos y reproductivos del girasol que luego fueron reemplazados por la barra de Schneiter y Miller (1981), que se encuentra ampliamente difundida y adoptada.

La formación de los órganos potenciales de cosecha se inicia con el proceso de diferenciación de los primordios del receptáculo, cuando la planta tiene aproximadamente entre ocho y doce hojas y finaliza cinco a siete días antes que el botón floral sea visible en el extremo superior de la planta. Los procesos que conducen a la diferenciación de las piezas florales son limitados principalmente por temperaturas bajas. En esta etapa, a igualdad de otras condiciones, la disponibilidad de fósforo y nitrógeno definen el número de flores. La diferenciación de los primordios florales comienza en la periferia del capítulo y termina al ocuparse toda la superficie disponible en el receptáculo (Marc y Palmer, 1981). Durante este período la expansión del receptáculo regula la producción de primordios y determina el número final de flores (Palmer y Steer, 1985).

En un régimen hídrico no limitante, el girasol consume mucha agua. Para las variedades actuales, en un régimen de evapotranspiración máxima, las necesidades de agua pueden alcanzar los 650 mm durante el ciclo. El consumo diario promedio puede alcanzar los 6 mm, pudiendo superar los 10 mm diarios. El girasol puede extraer importantes cantidades de agua del suelo (Meinke *et al.*, 1993; Dardanelli *et.al.*, 1997;

Moreno *et al.*, 1997) lo que es explicable por las propiedades de su sistema radicular (Aguirrezaabal, 1996). En la etapa VE - R3 el agua es tomada, principalmente, entre los 0 y 60 cm, pero entre R4 y R6 el 50 % del agua es tomada entre 60 y 120 cm o a mayor profundidad. La sensibilidad máxima a sequía está entre los 20 días previos y posteriores a la floración. La extracción de agua en profundidad es citada por numerosos autores (Mihalyfalvy, 1962; Vraneanu, 1977; Saumell, 1980). Experimentos conducidos por Bremner *et al.* (1986); Bremner y Preston (1990) y Puech y Gelfi (1995), quienes compararon la extracción de agua del sorgo y del girasol en el perfil de suelo, concluyeron que ambas especies toman similares cantidades de agua hasta 1 m de profundidad, pero el girasol toma entre 2 y 3 veces más agua que el sorgo entre 1 y 2 m, particularmente en ambientes con evapotranspiraciones mayores. El girasol extrae agua disponible hasta 1.5 - 1.75 m en contraste con 0.5 m para sorgo. Los mismos autores encuentran además que el girasol y el sorgo extraen el 92 y 62 % respectivamente del agua disponible entre 0 y 2 m. Aunque con alguna dispersión, se observó una alta correlación para diámetro y longitud de raíz pivotante y rendimiento de aquenio (Feoli, 1992).

Las relaciones número de aquenios/número de flores y peso de aquenio/rendimiento de aceite fueron significativamente afectadas por inducción artificial de estrés hídrico en cinco estados fenológicos de girasol. El efecto varió en función del momento de aplicación del estrés (Hall *et al.*, 1985). El carácter condicionante de los nutrientes fósforo y nitrógeno sobre los componentes de rendimiento en girasol es bien conocido (Osaki *et al.*, 1995; Carelli *et al.*, 1996; Strasser y Werner. 1995). En cultivos irrigados, el nivel de nitrógeno disponible antes y después

del inicio floral condiciona el número de aquenios por capítulo y el peso medio del aquenio respectivamente (Steer y Hocking, 1983). Aportes diferenciales de agua y nitrógeno y sus efectos sobre el índice de área foliar (IAF), la duración del área foliar (DAF), el número de aquenios por capítulo y el peso medio del aquenio fueron estudiados recientemente en Francia. El agua tuvo fuerte efecto sobre el número de aquenios por capítulo, el peso medio del aquenio, la DAF y el IAF (Texier, 1991).

1.3. Antecedentes embriológicos sobre girasol

Según Prakash (1979) la embriología es la disciplina morfológica más especializada, lo que genera falta de investigaciones embriológicas completas. Este autor considera que es necesario ampliar el conocimiento embriológico de especies con valor económico, aún sabiendo que el estudio embriológico exhaustivo de una especie puede llevar hasta cinco años.

Existen algunos estudios que tratan aspectos de la embriología del girasol, pero estos son generalmente contradictorios e incompletos. El desarrollo del saco embrionario antes y después de la fertilización ha sido investigado utilizando microscopía óptica y electrónica (Ustinova, 1964; Newcomb, 1973 a; Newcomb, 1973 b; Yan *et al.*, 1990). Horner (1977), Szabó *et al.* (1984) y Laveau *et al.* (1989) han realizado estudios comparativos entre la microsporogénesis de líneas fértiles y de líneas androestériles. En la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento el origen de

los genotipos no es especificado.

A pesar de la gran cantidad de trabajos fisiológicos que estudian el desarrollo de los granos y el rendimiento del cultivo bajo sequía (Hall *et al.*, 1989; Whitfield *et. al.*, 1989; Hall *et al.*, 1990 a; Hall *et al.*, 1990 b; Chimenti *et al.*, 2002) hasta el momento no se han propuesto explicaciones a las mermas de rendimiento como consecuencia de niveles subóptimos de disponibilidad de agua asociados con alteraciones de la embriología normal. Cantagallo *et al.* (2004) analizaron el rendimiento del cultivo bajo estrés lumínico durante la ontogenia de las flores, la antesis y la formación de los frutos. Dicho trabajo es el único en el que se relaciona un tipo de estrés ambiental con el desarrollo de la semilla y el fruto del girasol. Sin embargo, en él no se describen los procesos desde un punto de vista embriológico.

1.4. Planteo del problema

Parte de las mermas en el rendimiento potencial del girasol se deben al aborto de flores y frutos. Los abortos ocurren en diferentes estadios del desarrollo y en distintos sectores del capítulo. Este proceso (“vaneo”) puede reconocer, entre otras causas, anormalidades en el proceso reproductivo acontecidas bajo algún tipo de estrés ambiental. La detección de anormalidades embriológicas sólo es posible si se cuenta con un patrón de referencia, es decir si se conoce previamente la embriología ‘normal’ del girasol. Por ello fue necesario realizar primero el estudio de la esporogénesis y la

gametogénesis, así como el de las estructuras esporofíticas relacionadas, bajo condiciones ambientales óptimas, y luego se repitió el estudio bajo diferentes condiciones de estrés hídrico (impuestas dentro del rango de esta variable que puede presentarse en condiciones reales de cultivo). Se esperaba así identificar procesos y etapas en los que esta especie presenta vulnerabilidad a condiciones adversas relacionadas con la disponibilidad de agua.

Dada la existencia de autoincompatibilidad en algunos genotipos de girasol, el estudio del desarrollo embrionario bajo distintas condiciones de polinización permitiría evaluar este factor como otra posible causa de fallas embriológicas. Por lo tanto se investigó también el efecto de la identidad del dador de polen (polen propio vs. polen de otro genotipo) en el desarrollo del embrión y la dinámica del crecimiento de los tubos polínicos.

1.5. Objetivos generales:

- Describir el desarrollo embriológico del girasol en plantas cultivadas en condiciones óptimas de crecimiento, con atención a: 1) la diversidad genotípica que presentan los materiales actualmente cultivados en la Argentina; 2) la diversidad de posiciones que ocupan las flores en el capítulo; y 3) la identidad de los genotipos paterno y materno involucrados en la reproducción.
- Evaluar el efecto del estrés hídrico en el desarrollo embriológico del girasol con

atención a las mismas variables.

- Aportar datos al conocimiento embriológico de la familia Asteraceae, y contribuir a la comprensión de los efectos del estrés hídrico sobre el desarrollo embriológico de Angiospermas.

1.6. Objetivos particulares:

- Describir la microsporogénesis y la microgametogénesis.
- Estudiar la megasporogénesis y megagametogénesis.
- Evaluar la dinámica del crecimiento de los tubos polínicos.
- Describir la fertilización y la endospermogénesis.
- Estudiar la embriogénesis.

CAPITULO II

Materiales y métodos



2.1. Materiales utilizados

Se usaron tres híbridos comerciales de girasol, P 30, CF 17 y DK 4050, y una línea endocriada, HA 89, los cuales fueron cultivados en áreas experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Las plantas fueron sembradas en macetas individuales de 50 L., llenadas con una mezcla de tierra, arena y arcilla (4:2:1, v/v/v). Las macetas fueron distribuidas como un cultivo y fueron regadas cuando era necesario. Se agregaron a cada maceta 25 gr. de NPK (15/15/15) cuando las plantas presentaban seis hojas. Se controlaron las malezas principalmente con roundup (Monsanto). Se cosecharon aproximadamente 200 flores de cada genotipo, en distintos estadios de maduración y procedentes de tres regiones del capítulo (centro, medio y periferia), que se destinaron a estudios por microscopía óptica y electrónica

2.2. Preparación del material para microscopía óptica

Las flores y frutos cosechados se fijaron en FAA (formaldehído - alcohol etílico, ácido acético glacial, agua = 2:10:1:7 v/v).

Se utilizaron técnicas histológicas de rutina (D'Ambrogio, 1976): deshidratación en serie ascendente de alcoholes (alcohol etílico-xilol), inclusión en parafina, cortes seriados de 5 a 10 μm de espesor, tinción doble de safranina - fast green y montaje en medio sintético. Bajo microscopio óptico se midieron aproximadamente 50 sacos

embrionarios y 50 granos de polen para cada combinación genotipo-posición de la flor en el capítulo-tratamiento (normal y estresado). Cortes longitudinales de estigmas desparafinados fueron coloreados con Azul Brillante de Coomassie para localizar proteínas (Heslop-Harrison et al., 1973) y con Sudan Black B para detectar lípidos (Pearse, 1961).

Se efectuaron dibujos con cámara clara en un microscopio Wild M20, se tomaron fotografías con una cámara digital Canon PowerShot A650 IS y se armaron las láminas correspondientes.

2.3. Preparación del material para microscopía electrónica

2.3.1. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para analizar la morfología de los granos de polen y de los cuerpos de Ubisch en la membrana peritapetal de la antera se aplicaron técnicas para microscopía electrónica de barrido (O'Brien y Mc Cully, 1981). Anteras maduras previamente fijadas en FAA fueron deshidratadas en una serie ascendente de alcoholes. El material fue secado por punto crítico, metalizado con oro-paladio y observado y fotografiado con un microscopio Philips XL30.

2.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para realizar los estudios ultraestructurales de los estilos, estigmas y embriones se aplicaron técnicas de microscopía electrónica de transmisión (O'Brien y Mc Cully, 1981). El material fue fijado en glutaraldehído 3 % en buffer fosfato pH 7,6 y refijado en tetróxido de osmio 1,5 % en buffer fosfato de igual pH. Posteriormente se deshidrató en una serie ascendente de alcoholes y se incluyó en resina epoxy. Luego se realizaron cortes semifinos de 1 μm de espesor los cuales fueron teñidos con azul de toluidina. Se hicieron, también, cortes ultrafinos de 750 a 900 nm. Estos últimos se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones fueron observadas y fotografiadas en un microscopio JEOL-JEM 1200 EX II TEM a 85.0 kv.

2.4. Efecto de la identidad del dador de polen

Por una parte, se analizaron frutos maduros de los híbridos CF 17 y P 30 provenientes de los siguientes tratamientos realizados durante la temporada de cultivo 2004: control, exclusión de polinizadores, autopolinización, polinización cruzada entre individuos de un mismo híbrido y entre individuos de distintos híbridos.

Por otra parte, se realizó un experimento para establecer la dinámica del crecimiento de los tubos polínicos bajo diferentes condiciones de polinización. En diciembre de 2006 se sembraron semillas de los híbridos DK 4050 y P 30 en macetas

individuales. Se colocó a DK 4050 en el centro de la parcela y a P 30 en la periferia. Se dejaron al aire libre en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires con riego por goteo. Se fijaron en FAA flores de ambos híbridos en todos los estadios de desarrollo. Se realizaron cruzamientos entre ambos híbridos utilizando: 1) P 30 como dador y DK 4050 como receptor (polinización cruzada) con alta polinización; 2) P 30 como dador y DK 4050 como receptor (polinización cruzada) con baja polinización; 3) entre individuos de DK 4050 (autopolinización), con alta polinización; y, 4). entre individuos de DK 4050 (autopolinización), con baja polinización. Se fijaron flores en FAA inmediatamente después de realizado el cruzamiento, cada cinco minutos durante la primer media hora, cada diez minutos durante la segunda media hora, cada veinte minutos durante las siguientes tres horas y se continuó fijando aproximadamente cada una o dos horas hasta completar los tres días. Se comparó el tiempo de germinación de los tubos polínicos en los cuatro tratamientos y se confeccionó una barra temporal del crecimiento del tubo polínico y del desarrollo del embrión.

2.5. Efecto del estrés hídrico

En noviembre de 2005 se sembraron en el campo experimental de la Facultad de Agronomía (UBA), semillas del híbrido comercial DK 4050 en 32 macetas individuales de 50 L., llenadas con una mezcla de tierra, arena y arcilla (4:2:1, v/v/v). Las mismas fueron divididas en ocho grupos (T1-T8) de cuatro plantas cada uno. Cada grupo se sometió a distintas condiciones ambientales. Las plantas en el grupo T1 (grupo control,

mantenido al aire libre) y en el grupo T2 (grupo control, dentro de un invernáculo) se regaron diariamente de manera que el sustrato se mantuvo a capacidad de campo. La comparación T1-T2 revelaría la extensión del efecto, en caso de existir, que las condiciones del invernáculo tendrían sobre el desarrollo normal de las plantas. Las plantas en los grupos T3-T8 se mantuvieron dentro del invernáculo y fueron regadas diariamente manteniéndose el sustrato a capacidad de campo. Cuatro días antes de entrar en el estadio a evaluar las macetas se dejaban de regar. Las plantas fueron estresadas en distintas etapas del desarrollo, usando como guía los estadios establecidos por Schneiter y Miller (1981): Grupo T3: en los estadios R 2-R 3 (primordio floral); T4: R 4 (flores periféricas en pre – antesis); T5: R 5 (flores periféricas con las anteras expuestas); T6: R 6 (flores periféricas con los estigmas expuestos); T7: R7 (flores periféricas en post – antesis, embrión joven); T8: R 9 (flores periféricas con el embrión maduro). Una vez que los dos primeros pares de hojas se tornaban amarillas se volvía a regar las plantas a diario.

Las inflorescencias exhiben un gradiente en el desarrollo ontogenético de la periferia (flores más tempranas) hacia el centro (últimas flores) del capítulo. Por lo tanto, una vez que las plantas de cada grupo eran estresadas, flores individuales fueron muestreadas de la periferia, medio y centro del capítulo y fijadas en FAA todos los días hasta que el capítulo llegó al estadio R9. Se midieron aproximadamente 15 megagametófitos jóvenes y maduros para cada tratamiento.

Se contaron los frutos que quedaron en cada inflorescencia (entre 700 y 1000) y se obtuvieron promedios para cada tratamiento a fin de estimar diferencias en el

rendimiento y relacionarlas con las observaciones embriológicas.

CAPÍTULO III

Microsporangio, microsporogénesis y microgametogénesis



3.1. Introducción.

Aunque se han realizado muchas investigaciones embriológicas en girasol pocas tratan en detalle la microsporogénesis y la microgametogénesis. Se han publicado algunos trabajos que comparan la microsporogénesis en flores androfértiles y en flores con androesterilidad citoplasmática (Horner, 1977; Szabó *et al.*, 1984; Laveau, 1989). Meric *et al.* (2003) describen los aspectos histológicos de la pared de la antera en la línea fértil HA 89 “B” y en la línea androestéril HA 89 “A” y confrontan sus resultados con los obtenidos previamente por Horner (1977). Sin embargo, no se ha realizado hasta el momento ningún estudio detallado de estos procesos ni se ha descripto con claridad al microsporangio y sus estructuras asociadas.

En este capítulo se expone el estudio comparativo del desarrollo de la pared de la antera, la microsporogénesis, la microgametogénesis y la morfología del grano de polen en los cuatro genotipos señalados en el punto 2.1 de esta tesis.

3.2. Resultados.

3.2.1. *Microsporangio.*

La pared de la antera joven consta, de afuera hacia adentro, de: epidermis, endotecio, una capa media y el tapete (Figs. 1C, 2C, 3C). El desarrollo de la pared de la antera coincide con el tipo Dicotiledóneo de Davis (1966) ya que la capa media y el endotecio comparten un mismo origen (Figs. 1A, 2A, 3A).

En los primordios florales, las células que forman las cuatro capas de la pared no se diferencian ni en forma ni en tamaño. Las células tapetales son las primeras en crecer y se encuentran binucleadas en el estadio de células madres de los micrósporos. Estas células tienen un citoplasma denso con cristales estiloides de oxalato de calcio (Figs. 1A-D, 2A-C, 3A-C). Durante la microsporogénesis se degradan las paredes tangenciales internas y radiales (Fig. 4A-C). Con la liberación de los micrósporos de las tétrades, el citoplasma de las células de este estrato invade el lóculo de la antera, la pared tangencial externa de las mismas también desaparece y comienza a formarse un periplasmodio que rodea a los jóvenes micrósporos unicelulares (Figs. 1C, D, 2C, D, 3C, D, 4D, 5A). El plasmodio se encuentra totalmente integrado en el estadio de grano de polen bicelular. Los cristales estiloides presentes en el tapete plasmodial de HA 89 son de aproximadamente 8 μm de largo mientras que los que se encuentran en DK 4050 miden 23 μm . CF 17 y P 30 no presentan tales cristales en sus células tapetales. El tapete es gradualmente consumido y ya no se observa cuando los granos de polen alcanzan el

estadio bicelular maduro en HA 89 y tricelular en los demás genotipos (Figs. 1E, F, 2E, 3E, 5B-D).

Simultáneamente con la integración del plasmodio, una membrana peritapetal se forma a partir de la cara tangencial externa del tapete. Esta membrana encierra los granos de polen maduros (Figs. 5D, 6C) una vez que el tapete se ha consumido totalmente, y cuerpos de Uebisch de aproximadamente 0,32 μm se observan en su superficie interna (Fig. 6 A, B).

Luego de la primera división meiótica, las células de la capa media comienzan un lento proceso de degradación. Al final del estadio de tétrade de micrósporos la mayoría de estas células se encuentran consumidas y ya no se observan restos de ellas en el estadio de micrósporos jóvenes (Figs. 1C, 2C, 3C).

Durante la microgametogénesis, se desarrollan engrosamientos fibrilares en las paredes tangenciales internas y radiales de las células del endotecio. Estos engrosamientos se interrumpen en la cara tangencial externa (Figs. 1E, F, 2D, E, 3E, 5A, B). De esta manera, el endotecio actúa mecánicamente en la dehiscencia de la antera. En CF 17 y P 30 los engrosamientos fibrilares se desarrollan en el estadio de grano de polen bicelular joven, mientras el tapete está aún presente (Fig. 2D). Las células del endotecio joven de HA 89 y las células de endotecio maduro de DK 4050 presentan cristales prismáticos y estiloides (Figs. 1C-F, 3E).

Las células de la epidermis crecen tangencialmente mientras la antera madura.

En los mismos estadios en los que se observan los engrosamientos fibrilares del endotecio se distingue una gruesa cutícula por fuera de la epidermis (Figs. 1E, F, 2D, E, 3E).

3.2.2. Microsporogénesis y microgametogénesis

El tejido esporógeno se diferencia una vez que las cuatro capas de la pared de la antera se han formado. Este tejido se distingue por la presencia de pocos espacios intercelulares y por células isodiamétricas con núcleos prominentes y paredes delgadas. A partir de este tejido se diferencian las células madres de los micrósporos mediante la deposición de una pared especial de calosa entre la membrana plasmática y la pared primaria (Figs. 1A, 2A, 3A, 4A). Subsecuentemente, dichas células se separan por la disolución de la laminilla media y las paredes primarias que mantenían unido al tejido esporógeno. Cada célula madre de los micrósporos sufre simultáneas divisiones reductivas y se forman así las tétradas de micrósporos con disposición tetraédrica (Figs. 1B, 2B, 3B, 4B).

Cada micrósporo se separa de la tétrada por la disolución de la pared de calosa que los mantiene unidos. Inmediatamente después de la liberación de los micrósporos en el interior del lóculo de la antera, comienza a depositarse sobre ellos la esporopolenina. Consecuentemente, se forma una gruesa pared de exina. Los micrósporos uninucleados jóvenes tienen un citoplasma vacuolado, y miden

aproximadamente 18 μm de diámetro en HA 89 y DK 4050, y 14 μm en CF 17 y P 30 (Figs. 1C, 2C, 3C, 4C).

Luego de la primera división mitótica de los micrósporos se forman una célula generativa pequeña y una célula vegetativa de mayor tamaño. La célula generativa se separa de la intina y se desplaza hacia una posición en la que se encuentra rodeada por la célula vegetativa. Una vez que los granos de polen se han formado, éstos aumentan su volumen, lo que genera el estiramiento tangencial y consecuente adelgazamiento de la exina. Los granos de polen bicelulares recién formados se encuentran bastante vacuolados. Miden aproximadamente 24 μm en HA 89, 29 μm en CF 17 y P 30, y 19 μm en DK 4050 (Figs. 1D, 2D, 3D). La célula vegetativa continúa su crecimiento, la vacuola desaparece gradualmente y el citoplasma se llena con granos de almidón. Finalmente, la célula generativa se divide mitóticamente y se forman dos células espermáticas. Los granos de polen tricelulares tienen prácticamente el mismo tamaño que los bicelulares y son liberados de la antera en este estadio, es decir, con las dos gametas formadas (Figs. 1F, 2E, 3E).

3.2.3. Morfología del grano de polen

Los granos de polen maduros son subobladados, triporados, anguloaperturados y esferoidales en vista polar. Se han observado granos de polen tetraporados únicamente en HA 89 (Fig. 5C). Tanto el mesocolpio como el apocolpio presentan un tectum con

superficie equinada y microperforaciones dispersas en la base de cada espina (Figs. 6C, D).

3.3. Discusión.

El desarrollo de la pared de la antera coincide con el tipo dicotiledóneo definido por Davis (1966). Esta característica ya había sido mencionada para otros miembros de la familia Asteraceae (Pullaiah 1979). El tapete fue descrito similarmente por Horner (1977) y es común para la familia (Pullaiah 1979). *Helianthus annuus* presenta un tapete plasmodial de tipo Selaginella ya que se integra completamente en el estadio de grano de polen bicelular.

Trabajos previos sobre la microsporogénesis y microgametogénesis de *Helianthus annuus* (Horner, 1977; Szabó *et al.*, 1984; Laveau *et al.*, 1989) no mencionan la presencia de una membrana peritapetal con cuerpos de Uebisch que encierra los granos de polen. Sin embargo, Szabó *et al.* (*op cit.*) hacen referencia a la presencia de un estrato intermedio entre el endotecio y el lóculo de una antera abierta, aunque no detallan su origen ni sus características. Heslop-Harrison (1969) describe dicha membrana en *Cosmos bipinnatus* (Heliantheae), *Ambrosia artemisiifolia* (Ambrosieae) y *Tagetes patula* (Helenieae), aunque no menciona la presencia de orbículas en la misma.

Las funciones de las orbículas están todavía bajo discusión. La mayoría de los autores consideran que son exclusivas de los tapetes secretores (Raghavan, 1997; Huysmans y El-Ghazaly, 1998; Furness y Rudall, 2001). Estudios ontogenéticos ultraestructurales sobre el desarrollo del grano de polen en *Abutilon pictum* (Hook. & Arn.) Walp. (Strittmatter *et al.*, 2000) y *Modiolastrum malvifolium* (Galati *et al.*, 2007), describen la presencia de una membrana peritapetal con orbículas en la antera madura. En estas especies, tanto las orbículas como la membrana peritapetal se desarrollan a partir de un tapete de tipo plasmodial o intermedio, al igual que en *Helianthus annuus*. Estos dos trabajos y la presente tesis son los primeros reportes de la presencia de orbículas asociadas a una membrana peritapetal, y a un tapete que no sea secretor. Por otra parte, la presente tesis constituye la primera mención sobre la presencia de orbículas en la familia Asteraceae.

Meric y Dane (2004) encontraron cristales estiloides de oxalato de calcio en las células del endotecio maduro y del tapete del girasol. Sin embargo, las células del endotecio joven de HA 89 y las células maduras de dicho tejido del híbrido comercial DK 4050 también presentan cristales prismáticos, anteriormente no informados en la literatura.

Las células madres de los micrósporos de *Helianthus annuus* se dividen simultáneamente y producen tétrades de micrósporos de disposición tetraédrica al igual que en las Asteraceae *Vernonia divergens* Benth. y *Adenostema lavenia* (L.) Kuntze; mientras que las de *Elephantopus scaber* L. (Vernoniaeae) y las de *Adenostema rugosum* Wt. (Eupatorieae), originan tétrades de micrósporos con un arreglo isobilateral

(Pullaiah, 1979).

Szabó *et al.* (1984) observaron entre dos y cuatro poros en los granos de polen de flores de la línea paternal restauradora CR – 3. En este trabajo se encontraron granos de polen triporados y tetraporados en la línea endocriada, HA 89, mientras que en los híbridos comerciales solamente se hallaron granos de polen triporados. Durante los distintos estadios de la microsporogénesis y de la microgametogénesis, todos los genotipos analizados difirieron en el tamaño de las micrósporos y de los granos de polen jóvenes. Sin embargo, cuando los granos de polen tricelulares alcanzan su máxima madurez, poseen el mismo tamaño en todos los híbridos, siendo éste mayor que el que se observa en la línea endocriada HA 89.

Según Laveau *et al.* (1989), los granos de polen de dos líneas fértiles, HA 89 y RHA 274 PL, son liberados en estadio bicelular, de manera que la segunda mitosis ocurre en el tubo polínico. Esto no concuerda con lo observado para los genotipos de *Helianthus annuus* estudiados aquí. En todos ellos, al igual que en la mayoría de los miembros de la familia, los granos de polen son liberados en estadio tricelular (Pullaiah, 1979; Johri *et al.*, 1992).

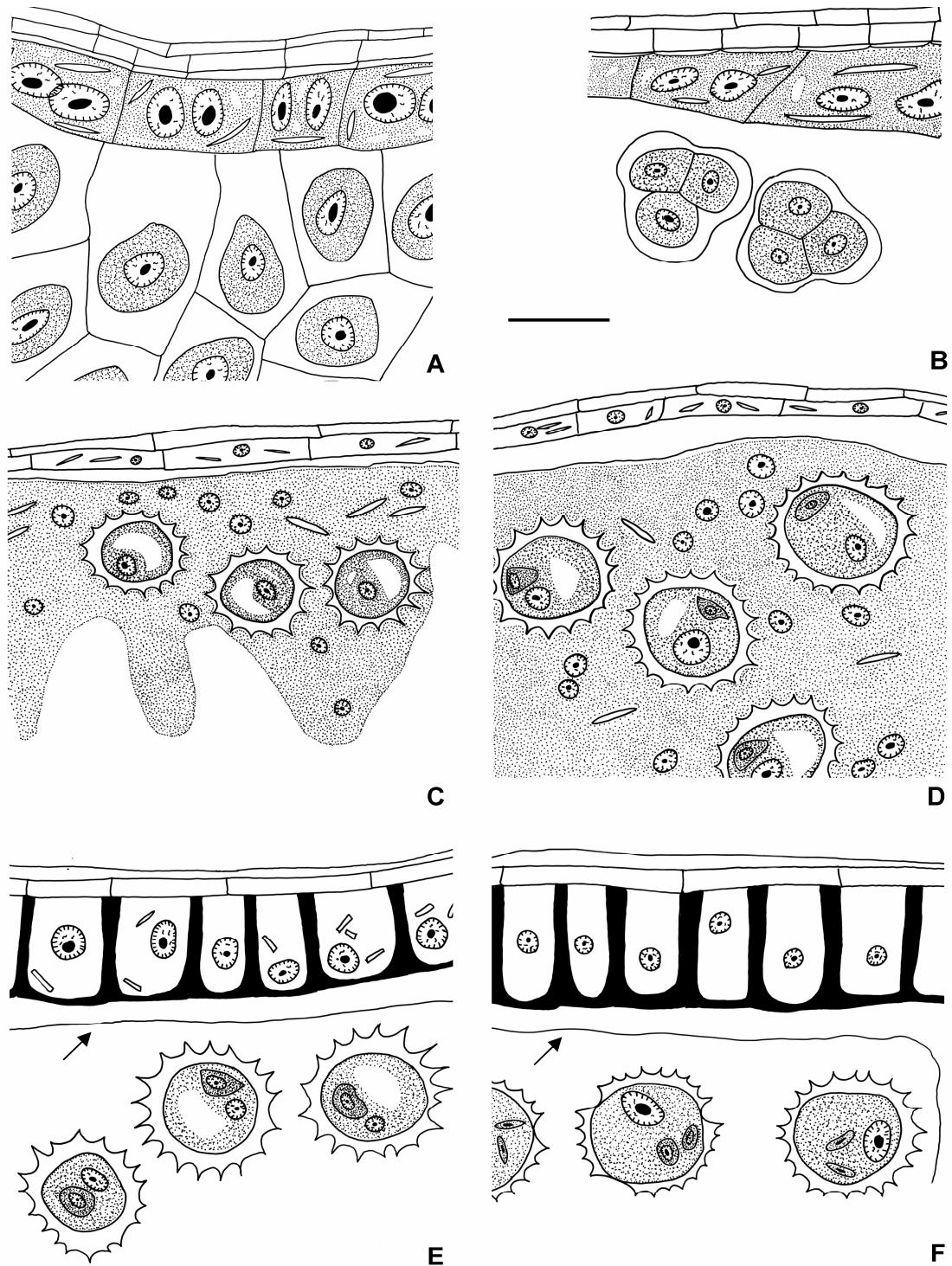


Figura 1 HA 89. Tejidos del microsporangio en distintos estadios de desarrollo. **A)** Estadio de CMm, tapete binucleado con cristales estiloides. **B)** Tetrades tetraédricas, capa media prácticamente consumida. **C)** Micrósporos libres, cristales estiloides en las células del endotecio y en el tapete plasmodial en desarrollo. **D)** Grano de polen bicelular joven, tapete plasmodial integrado. **E)** Grano de polen bicelular maduro, gruesa cutícula epidérmica, células del endotecio con engrosamientos fibrilares y cristales prismáticos, membrana peritapetal presente (flecha). **F)** Granos de polen tricelulares. *Barra: 18μm*

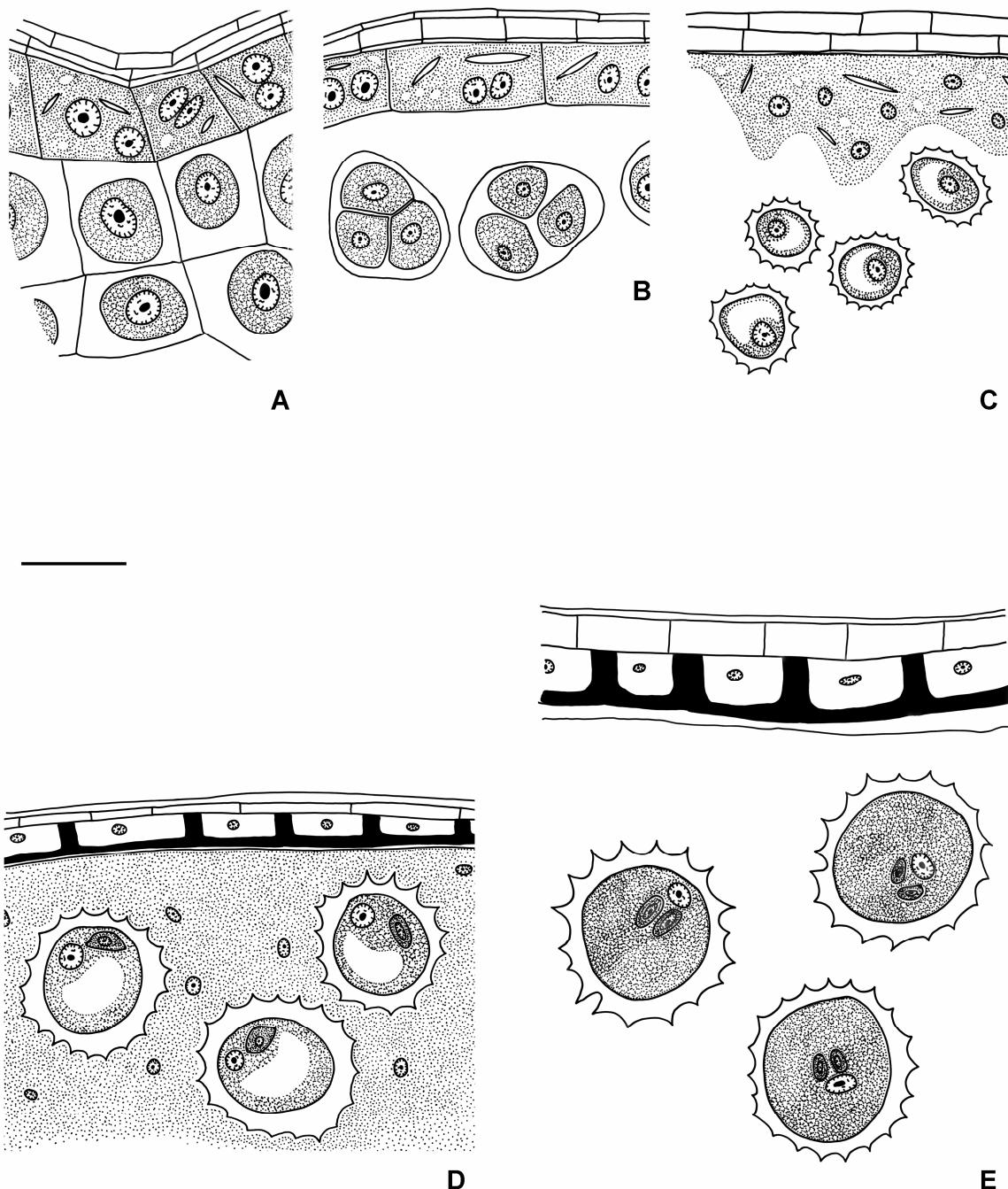


Figura 2. CF 17 y P 30. Tejidos del microsporangio en distintos estadios de desarrollo. **A)** Estadio de célula madre de los micrósporos, tapete binucleado con cristales estiloídes. **B)** Tetrades tetraédricas, capa media prácticamente consumida. **C)** Estadio de micrósporos libres, tapete invadiendo el lóculo de la antera. **D)** Estadio de grano de polen bicelular, cutícula epidérmica gruesa, células del endotecio con engrosamientos fibrilares, tapete completamente integrado sin cristales. **E)** Granos de polen tricelulares, membrana peritapetal presente. *Barra: 18μm*

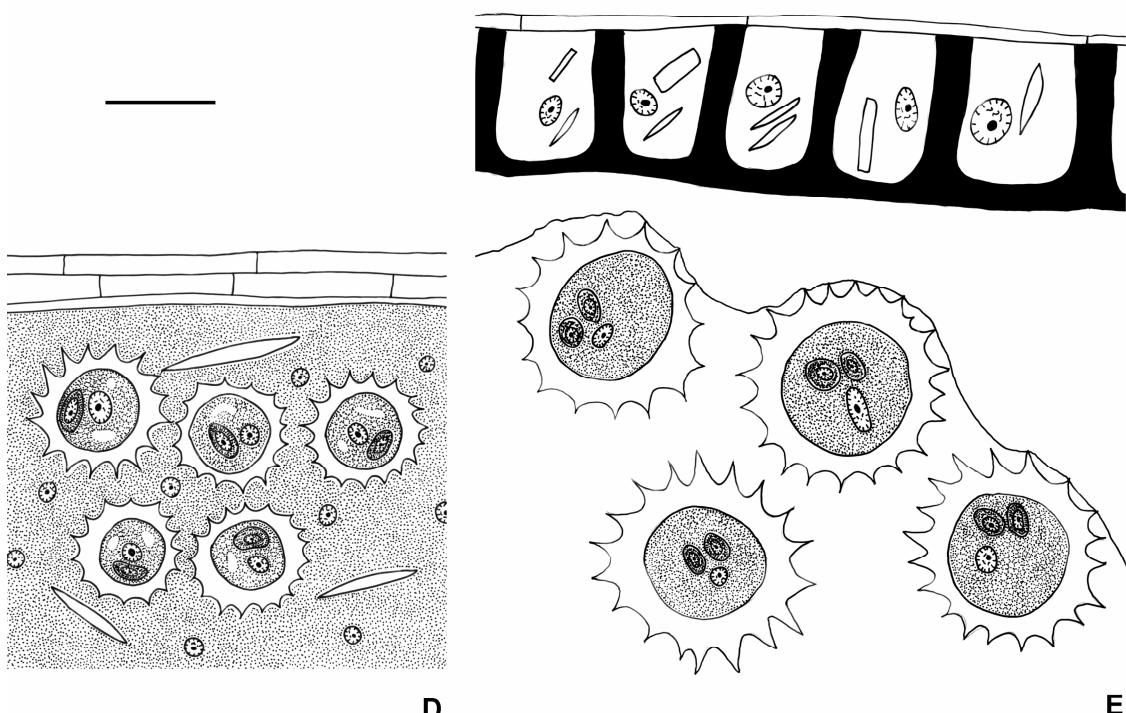
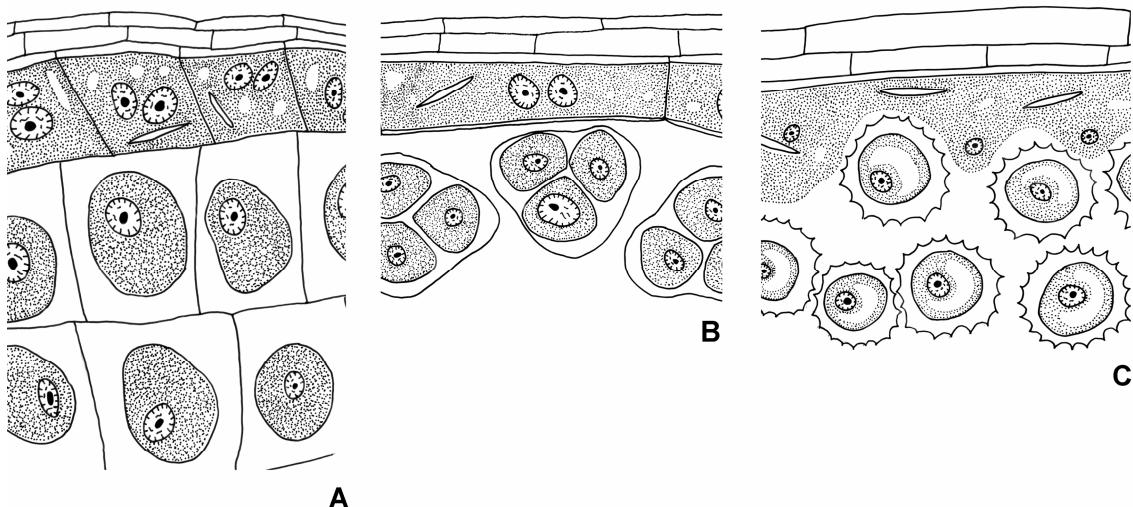


Figura 3. DK 4050. Tejidos del microsporangio en distintos estadios de desarrollo. **A)** Estadio de célula madre de los micrósporos, tapete binucleado con cristales estiloides. **B)** Tetrades tetraédricas, capa media prácticamente consumida. **C)** Estadio de micrósporos libres, tapete invadiendo el lóculo de la antera. **D)** Estadio de granos de polen bicelular, cutícula epidérmica gruesa, tapete completamente integrado. **E)** Granos de polen tricelulares, células del endotecio con engrosamientos fibrilares y cristales estiloides, membrana peritapetal presente. *Barra: 18μm*

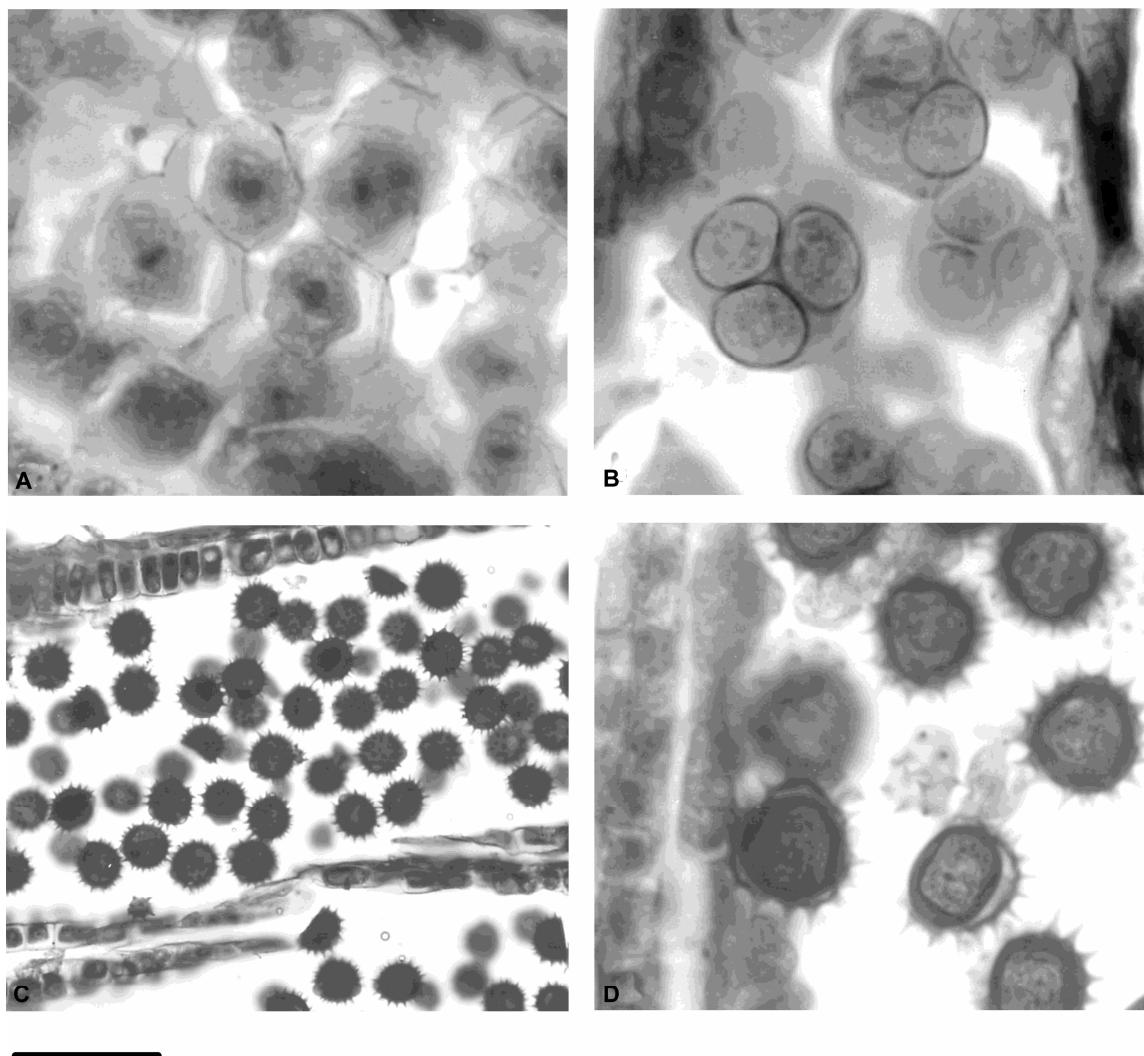


Figura 4. Microsporogénesis y microgametogénesis en CF 17 y P 30. **A)** Células madres de las micrósporos. **B)** Tétrades de micrósporos con disposición tetraédrica. **C)** Estadio de micrósporos libres, tapete invadiendo el lóculo de la antera. **D)** Micrósporos jóvenes, tapete plasmodial en formación. *Barra: A = 20 µm; B = 16 µm; C = 12 µm; D = 22 µm*

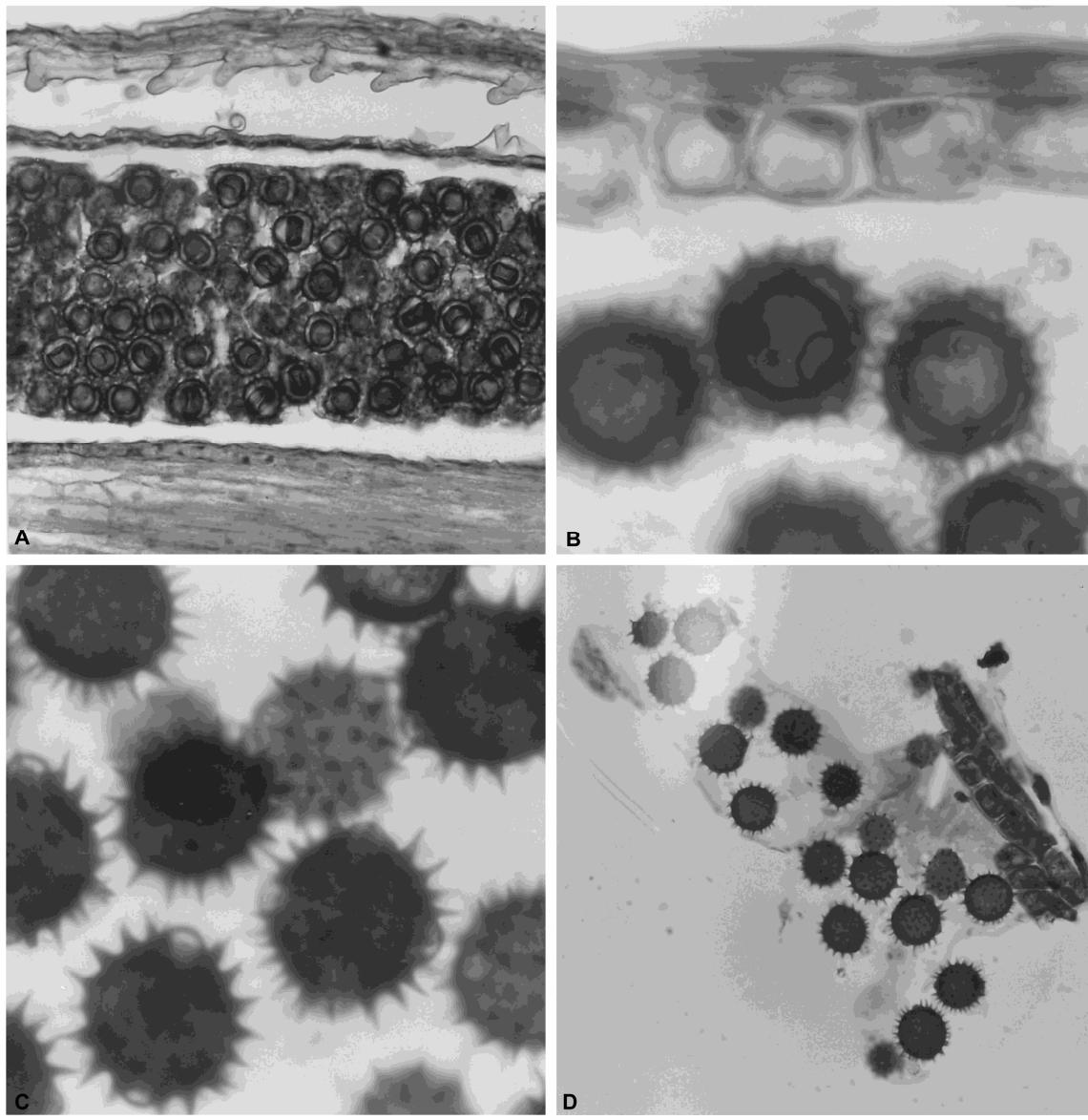


Figura 5. A – B: Microgametogénesis en CF 17 y P 30. C – D: HA 89. A) Granos de polen bicelulares, tapete consumido. B) Detalle de granos de polen bicelulares. C) Granos de polen tri- y tetraporados. D) Membrana peritapetal envolviendo los granos tricelulares. *Barra:* A = 83 μ m; B = 23 μ m; C = 17 μ m; D = 60 μ m.

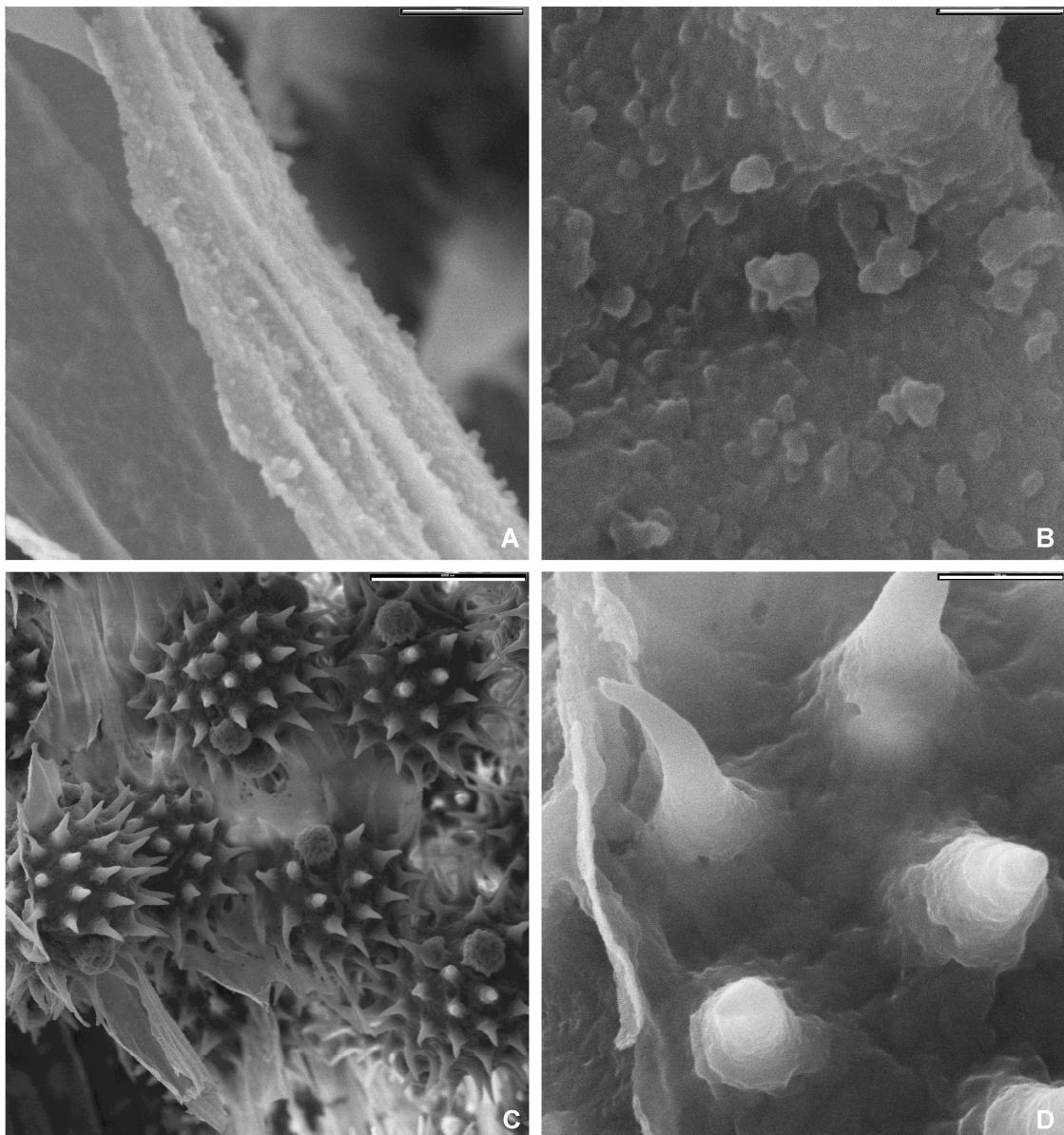


Figura 6. Cuerpos de Uebisch y granos de polen. MEB en P 30. **A)** Membrana peritapetal con cuerpos de Uebisch u orbículas. **B)** Detalle de las orbículas. **C)** Granos de polen y membrana peritapetal. **D)** Detalle de la exina. *Barra: A, C = 2000 nm; B = 1000 nm; D = 20000 nm.*

CAPÍTULO IV

Gineceo, óvulo, megasporogénesis y megagametogénesis



4.1. Introducción.

Existen algunas investigaciones realizadas con microscopio óptico y electrónico sobre el desarrollo del saco embrionario del girasol antes y después de la fertilización (Ustinova, 1964; Newcomb, 1973a; Newcomb, 1973b; Yan *et al.* 1990). Sin embargo, los genotipos con los que estos autores trabajaron no son especificados, y los híbridos y líneas endocriadas han ido cambiando debido al mejoramiento genético de la especie. Además, la información que aportan estos estudios contiene muchas contradicciones. El presente capítulo expone resultados del estudio de los materiales señalados en el punto 2.1 de la tesis.

4.2. Resultados.

4.2.1. Gineceo

El gineceo es bicarpelar con un solo lóculo y un solo óvulo por ovario. El estilo se inserta apicalmente y el estigma es bífido. Sin embargo, aproximadamente un 5 % de las flores poseen más de un óvulo por lóculo y más de un lóculo (Fig. 1A-C). Estas flores pueden presentar uno o dos estilos, no necesariamente en concordancia con el número de óvulos o de lóculos observados. La superficie del estigma está compuesta por papilas. El estilo es sólido con un cordón central de células elongadas que constituyen el tejido de transmisión.

4.2.2. Óvulo

El óvulo maduro es tenuinucelado (Figs. 3A, 5A, 7A), anátropo y unitegumentado. El óvulo se desarrolla de la placenta del ovario. Divisiones periclinales localizadas en las capas hipodérmicas de la placenta forman inicialmente una estructura en forma de domo (Fig. 2A). El desarrollo posterior del domo ocurre a mayor velocidad en uno de sus lados de manera que la protuberancia (nucela joven) muestra cierto grado de curvatura (Fig. 2B). Cerca de la región basal de la nucela comienza a desarrollarse el tegumento que la envuelve. En el estadio de célula madre de las megásporas el óvulo se observa con un giro cercano a los 180°, y alcanza su curvatura total en el estadio de tétrade de megásporas (Fig. 2C-E).

Durante los primeros estadios de desarrollo del óvulo, las células de la epidermis interna del tegumento se elongan radialmente, adquieren un citoplasma denso, presentan núcleos prominentes y dan origen al endotelio. En el estadio de célula madre de las megásporas, en el híbrido DK 4050 este tejido está formado por una única hilera de células uninucleadas (Fig. 7B). Por el contrario, en el mismo estadio de CF 17, P 30 y HA 89, el endotelio aún no se encuentra diferenciado. Las células del endotelio presentan hasta tres núcleos en el estadio de tétrade de megásporas y se mantienen en esta condición durante el desarrollo del saco embrionario (Figs. 3B, 5B, 7C). Con el crecimiento del óvulo, la nucela se degrada y el endotelio se pone en contacto directo con el gametófito femenino, cubriéndolo por completo. En CF 17, P 30 y HA 89 la nucela se encuentra totalmente consumida en el estadio de saco embrionario tetranucleado, mientras que en DK 4050 persiste hasta el estadio de saco embrionario

maduro.

4.2.3. Megasporogénesis y megagametogénesis

Las células parietales están ausentes y la célula madre de las megásporas (CMM) se encuentra presente justo por debajo de la epidermis nucelar (óvulo tenuinucelado). Cada óvulo desarrolla una única CMM con un núcleo conspicuo y un nucleolo prominente. (Figs. 3A, 5A, 7A, 10A)

La CMM se divide meióticamente dando lugar a una tétrade de megásporas de disposición lineal (Figs. 5B, 10B). La megáspora funcional es la calazal y se desarrolla en el megagametófito. mientras que las tres micropilares degeneran (Figs. 3B, 7C, D, 9C).

La megáspora funcional aumenta de volumen (Figs. 3C, 5C, 7D) y su núcleo sufre una primera división mitótica que no es acompañada por la formación de paredes. Los núcleos resultantes son empujados a los polos opuestos por la formación de una vacuola central (Figs. 3D, 7E). Una siguiente cariocinesis mitótica da lugar a un gametófito femenino tetranucleado, con dos núcleos en cada polo (Fig. 10D). Los sacos embrionarios tetranucleados de DK 4050 varían en su longitud (112 μm -150 μm) y tienen un citoplasma más vacuolizado que el resto de los genotipos (Figs. 3E, 7F, G). Tanto en los sacos embrionarios binucleados como en los tetranucleados de dicho

híbrido se han observado núcleos con vacuolas nucleolares. Luego de una última división mitótica, se lleva a cabo la citocinesis y se forma el saco embrionario que consta de seis células. Presenta un aparato oosférico, la célula media y dos antípodas (Fig. 8A-C). El saco embrionario joven de HA 89 mide aproximadamente 160 μm de longitud mientras que CF 17 y P 30 tienen sacos embrionarios de aproximadamente 195 μm (Figs. 4A, 5D). Los gametófitos femeninos jóvenes de DK 4050 varían considerablemente de tamaño. Se encontraron sacos embrionarios desde 121 μm hasta 194 μm de largo (Fig. 8A, B). Los megagametófitos presentan diferentes morfologías de acuerdo al genotipo (Fig. 9E, F), las cuales se describen a continuación.

4.2.3.1. HA 89

Las sinérgidas del saco embrionario joven son cortas, con un citoplasma denso y núcleos más o menos prominentes. Las vacuolas se encuentran en el extremo calazal y los núcleos por encima de éstas, hacia el extremo micropilar (Fig. 4A, B). Después de la formación del megagametófito, las sinérgidas empiezan a elongarse y alcanzan su máxima longitud en el saco embrionario maduro. En este estadio, los núcleos pueden encontrarse en el extremo micropilar o en una posición casi central, mientras que las vacuolas siempre se observan ubicadas en el polo chalazal (Fig. 4C-E).

El saco embrionario joven presenta una oosfera más o menos redondeada, con un citoplasma denso, un núcleo calazal y una gran vacuola micropilar (Fig. 4A, B). Esta

célula puede elongarse en mayor o menor medida, y la vacuola acompaña este crecimiento (Fig. 4C-E).

La célula media joven tiene dos núcleos polares cercanos, empujados por dos grandes vacuolas (Fig. 4A). Estos núcleos se fusionan rápidamente para formar un núcleo polar secundario conspicuo (Fig. 4B). A medida que el saco embrionario madura, la célula media se acorta, su citoplasma se vuelve más denso y las vacuolas se reducen (Fig. 4C-E).

El gametófito femenino joven presenta dos antípodas con uno a numerosos núcleos cada una y vacuolas pequeñas a medianas. Estas células se encuentran separadas entre sí y de la célula media por paredes rotundas (Fig. 4A, B). En el saco embrionario maduro estas paredes pueden estar presentes (Fig. 4C, E) o no (Fig. 4D). En este estadio el número de antípodas puede variar. Se observaron sacos embrionarios maduros con dos (Fig. 4C), tres (Fig. 4E) y cuatro antípodas (Fig. 4D), las cuales presentaban uno a diez núcleos cada una (Figs. 4A-E).

4.3.2.2. *P 30 y CF 17*

Las sinérgidas del saco embrionario joven se encuentran alargadas hacia el extremo micropilar. Poseen vacuolas y núcleos en el extremo micropilar (Fig. 5D). El tamaño de las sinérgidas no varía luego de la fusión de los núcleos polares (Fig. 5E). En

el saco embrionario maduro se observaron sinérgidas con distintas morfologías y polaridades (Figs. 5F, 6A-D). Sin embargo, en la mayoría de los casos los núcleos se encuentran en una posición central (Fig. 6A-C), mientras que las vacuolas suelen estar en el extremo calazal (Fig. 6B-D).

La oosfera del gametófito femenino joven es oblonga, tiene una única vacuola micropilar y un núcleo calazal (Fig. 5D, E). Con el crecimiento del saco embrionario, ésta puede elongarse hacia el extremo micropilar (Fig. 6D), aumentar su volumen (Fig. 6C) o puede conservar su tamaño original (Figs. 5F, 6A, B). En algunos casos, su núcleo se vuelve más conspicuo (Fig. 6C, D), y puede presentar una vacuola nucleolar (Figs. 5E, 6A-C).

La célula media joven posee dos núcleos separados por una gran vacuola central (Fig. 5D). Ambos núcleos se fusionan tempranamente en el desarrollo del megagametófito (Fig. 5E). El núcleo polar secundario suele ser prominente y generalmente se lo encuentra en el extremo micropilar de la célula (Figs. 5E, F, 6A, C, D) aunque se han observado casos donde éste es pequeño y tiene una posición más central (Fig. 6B). Se han observado vacuolas nucleolares (Figs. 5D, 6A, C). La célula media aumenta su tamaño a medida que el saco embrionario crece y en ocasiones se prolonga hacia el extremo micropilar, rodeando la oosfera y parte de las sinérgidas (Figs. 5F, 6D). La célula media se mantiene altamente vacuolizada en todas las etapas del desarrollo (Figs. 5D-F, 6A-D).

El saco embrionario joven presenta únicamente dos antípodas vacuolizadas con

dos o más núcleos cada una y paredes delgadas (Fig. 5D). La mayoría de los gametófitos femeninos maduros presentan dos antípodas, con vacuolas y varios núcleos (Figs. 5E, 6A-D). Se han observado casos en los que el número de antípodas ascendía hasta cuatro (Fig. 5F). Todos los sacos embrionarios maduros presentan antípodas que se encuentran separadas entre sí y de la célula media por paredes rotundas (Figs. 5E, F, 6A-D).

4.3.2.3. *DK 4050*

Las sinérgidas del megagametófito joven son cortas y se prolongan hacia el extremo calazal rodeando a la oosfera. Tienen núcleos prominentes y citoplasma denso (Figs. 8A-C, 9A). A medida que el saco embrionario madura, las sinérgidas se alargan hacia el extremo micropilar, alcanzando una longitud considerablemente mayor que la original (Figs. 8D, 9B-E). Sus núcleos suelen tener una posición central y las vacuolas, si están presentes, se encuentran en el extremo calazal. La forma de la sinérgidas maduras es similar en todos los casos observados (Figs. 8D, 9B-E).

La oosfera joven se observa ovalada en corte, con un citoplasma denso y un núcleo conspicuo (Figs. 8A-C, 9A). A medida que madura, puede conservar su tamaño (Fig. 9D) o crecer hacia la micrópila (Figs. 8D, 9B, C, E). Generalmente, una gran vacuola empuja el núcleo de la célula madura hacia el extremo calazal (Fig. 9B-E). Sin embargo, se han observado oosferas con dos vacuolas, una micropilar y otra calazal,

quedando el núcleo en una posición central (Fig. 8D). Algunos sacos embrionarios presentan oosferas cuyos núcleos tienen vacuolas nucleolares (Figs. 8C, D, 9B, D, E).

La célula media posee inicialmente dos prominentes núcleos cercanos entre sí, polarizados ambos hacia el extremo calazal por la presencia de una gran vacuola (Fig. 8A, B). Dicha célula puede ser corta y ancha (Fig. 8A) o larga y delgada (Fig. 8B). Los dos núcleos se fusionan inmediatamente y el núcleo polar secundario migra primero hacia el centro de la célula (Figs. 8C, 9A), llegando finalmente al extremo micropilar. Éste puede ser conspicuo o no. La célula media madura suele tener numerosas vacuolas pequeñas (Figs. 8D, 9B, C, D). Su forma es más o menos rectangular en corte y en algunos casos se proyecta hacia la micrópila rodeando a la oosfera y parte de las sinérgidas (Fig. 8C-E). En la mayoría de los gametófitos observados, el núcleo polar secundario posee una gran vacuola nucleolar (Figs. 8C, D, 9B, D, E).

El saco embrionario joven presenta dos antípodas con paredes delgadas. La antípoda micropilar es binucleada y la calazal uninucleada (Figs. 8A-C). Estas células varían en longitud pero todas poseen una gran vacuola, que en el caso de la antípoda micropilar separa sus dos núcleos. A medida que el gametófito femenino madura, el número de núcleos en las antípodas aumenta. En sacos embrionarios con una maduración intermedia pueden observarse cuatro y dos núcleos respectivamente (Fig. 9A) mientras que las antípodas maduras pueden tener hasta 32 núcleos (Fig. 8C). En este último caso el grado de vacuolización disminuye y el citoplasma aumenta su densidad. En la mayoría de los megagametófitos se han observado únicamente dos antípodas con paredes delgadas (Figs. 8D, 9B, C). Sin embargo, se han encontrado

algunos pocos sacos embrionarios con una pared rotunda que separa la antípoda calazal de la micropilar (Fig. 9D) y otros con cuatro antípodas, la micropilar separada de la célula media por una pared rotunda (Fig 9E).

4.4. Discusión

Helianthus annuus presenta un ovario ínfero, bicarpelar y unilocular, con un único óvulo anátropo, unitegumentado y tenuinucelado, como otras especies de Asteraceae (Pullaiah, 1979). Pullaiah (1979) menciona la presencia de dos óvulos por ovario en alrededor del 3 % de los ovarios de *Elephantopus scaber*. Esta característica aparece en los genotipos estudiados en este trabajo junto con la presencia de dos o tres lóculos y dos o tres estilos.

De acuerdo a Newcomb (1973a), el endotelio se diferencia en el estadio de célula madre de las megásporas como una única hilera de células que se tiñen más oscuras y rodean ambos lados y la porción micropilar del tejido nuclear, como se observó en el híbrido comercial DK 4050. Sin embargo, la epidermis interna del tegumento de los otros genotipos aquí estudiados, se elonga radialmente, se torna glandular y funciona como tapete tegumentario más tarde, en el estadio de tétrade de megásporas, en concordancia con las observaciones realizadas por Pullaiah (1979) en especies pertenecientes a las tribus Vernonieae y Eupatorieae. Según Newcomb (1973a) solo algunas pocas células del endotelio se encuentran binucleadas debido a la

malformación de las paredes que separan ambos núcleos. En este trabajo se ha observado que las células del endotelio de todos los genotipos estudiados tienen entre dos y tres núcleos.

Las células de la nucela del los híbridos comerciales CF 17 y P 30, y de la línea HA 89, empiezan a degradarse en el estadio de saco embrionario binucleado y prácticamente están ausentes en el estadio de saco embrionario tetranucleado. Esto concuerda con las observaciones de Newcomb (1973a). Sin embargo, las células de la nucela del híbrido DK 4050 terminan de degradarse cuando el saco embrionario se encuentra totalmente formado y los núcleos polares ya se han fusionado.

Durante el desarrollo del saco embrionario todos los núcleos contienen un único nucleolo que puede o no tener una gran vacuola. Esto había sido mencionado únicamente para la oosfera y para la célula media (Newcomb, 1973a; Yan *et al.*, 1991).

El saco embrionario tetranucleado de HA 89 presenta una vacuola central muy grande que deja una capa fina de citoplasma que conecta la región calazal con la micropilar. Cada extremo del citoplasma contiene dos núcleos. Newcomb (1973a) realiza una descripción muy semejante. Por otro lado, los sacos embrionarios en dicho estadio de desarrollo de DK 4050, contienen un citoplasma mucho menos denso con numerosas y amplias vacuolas que separan a los cuatro núcleos entre sí. Este híbrido comercial presenta sacos embrionarios tetranucleados de diferentes tamaños.

A pesar de la gran cantidad de flores analizadas, no se pudo observar el saco

embrionario octonucleado. Newcomb (1973a), quien tampoco logró encontrarlo, sugiere que esto puede deberse a que las divisiones ocurren muy rápido o bien durante la noche. En este trabajo se analizaron flores recolectadas y fijadas en distintas horas del día con el objetivo de hallar el estadio faltante. Sin embargo, dado que el mismo no pudo observarse, se concluye que en los sacos embrionarios que presentan seis células y ocho núcleos, la citocinesis ocurre simultáneamente a la tercera mitosis, por lo que el resultado es un megagametófito del mismo tamaño que el saco embrionario tetranucleado.

Newcomb (1973a) y Yan *et al.* (1991) basaron la mayoría de las descripciones de las sinérgidas en sacos embrionarios maduros. En los gametófitos femeninos jóvenes, las sinérgidas son generalmente cortas, presentan un citoplasma denso y núcleos prominentes. En los megagametófitos maduros, presentan diferentes polaridades. Sin embargo, las vacuolas suelen ser calazales y los núcleos quedan ubicados en el centro de la célula. Esto coincide con las observaciones previas realizadas por otros autores (Newcomb, *op. cit.*; Yan *et al.*, *o.p cit.*).

El gametófito femenino joven de girasol presenta dos antípodas, en contraste con la ocurrencia general de tres antípodas en el saco embrionario normal tipo *Polygonum* (Maheshwari, 1950). Newcomb (1971) hace mención de esto en su estudio. De acuerdo con Pullaiah (1979), *Adenostema rugosum* Wt., *A. lavenia* (L.) Kuntze, *Vernonia elaeagnifolia* DC. y *V. divergens* Benth. presentan dos o tres antípodas. En el primer caso, la antípoda micropilar posee siempre dos núcleos y la calazal uno. Lo mismo pudo observarse en los sacos embrionarios de DK 4050. Aunque la mayoría de los

megagametófitos permanecen con dos antípodas, varios desarrollan tres o cuatro, probablemente por una posterior división de las originales. En todos los casos, el número de núcleos aumenta en la antípoda micropilar y, algunas veces, en todas estas células. Ustinova (1964) y Newcomb (1973a) describieron variaciones similares, aunque la primera autora dice que las antípodas se desarrollan inicialmente de tres células ubicadas en la región calazal y que luego la micropilar generalmente degenera. En esta investigación no se observaron características semejantes. Los genotipos P 30, CF 17 y HA 89 presentan en la mayoría de sus sacos embrionarios antípodas con paredes muy gruesas y rotundas. Éstas aparecen más raramente en el híbrido comercial DK 4050.

De acuerdo con las observaciones realizadas, se puede concluir en primer lugar que las diferencias encontradas entre los genotipos estudiados en este trabajo pueden justificar las contradicciones que existen entre los reportes previos. En segundo lugar, no se puede adjudicar el aborto de los frutos a anormalidades durante el desarrollo del saco embrionario, ya que todas las variantes de megagametófitos descriptas podrían ser normalmente fecundadas para formar semillas viables.

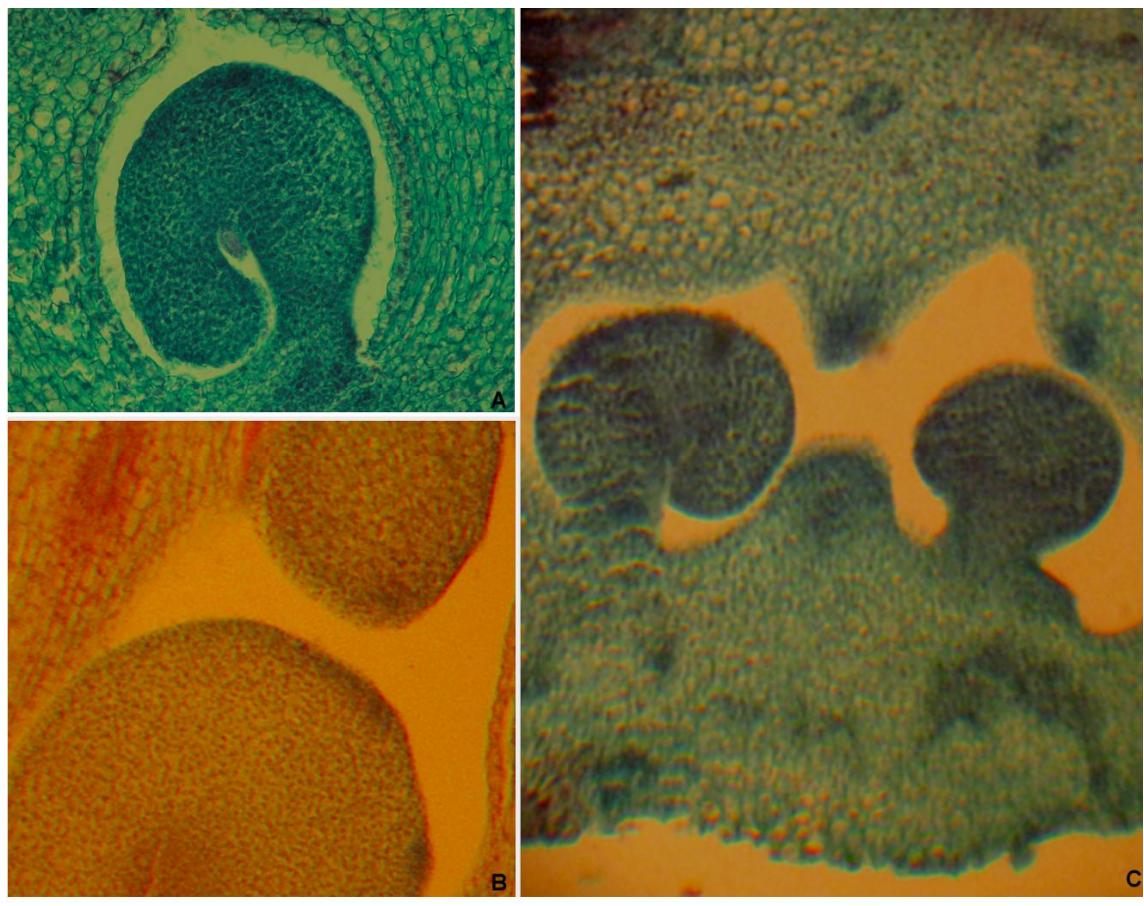


Figura 1. Gineceo. **A)** Un único óvulo anátropo en el lóculo, estilo de inserción apical. **B)** Vistas parciales de dos óvulos en un mismo lóculo. **C)** Dos óvulos enfrentados en un mismo lóculo, inicio de formación de un tabique entre ambos. *Barra: A y C: 80 µm; B: 60 µm.*

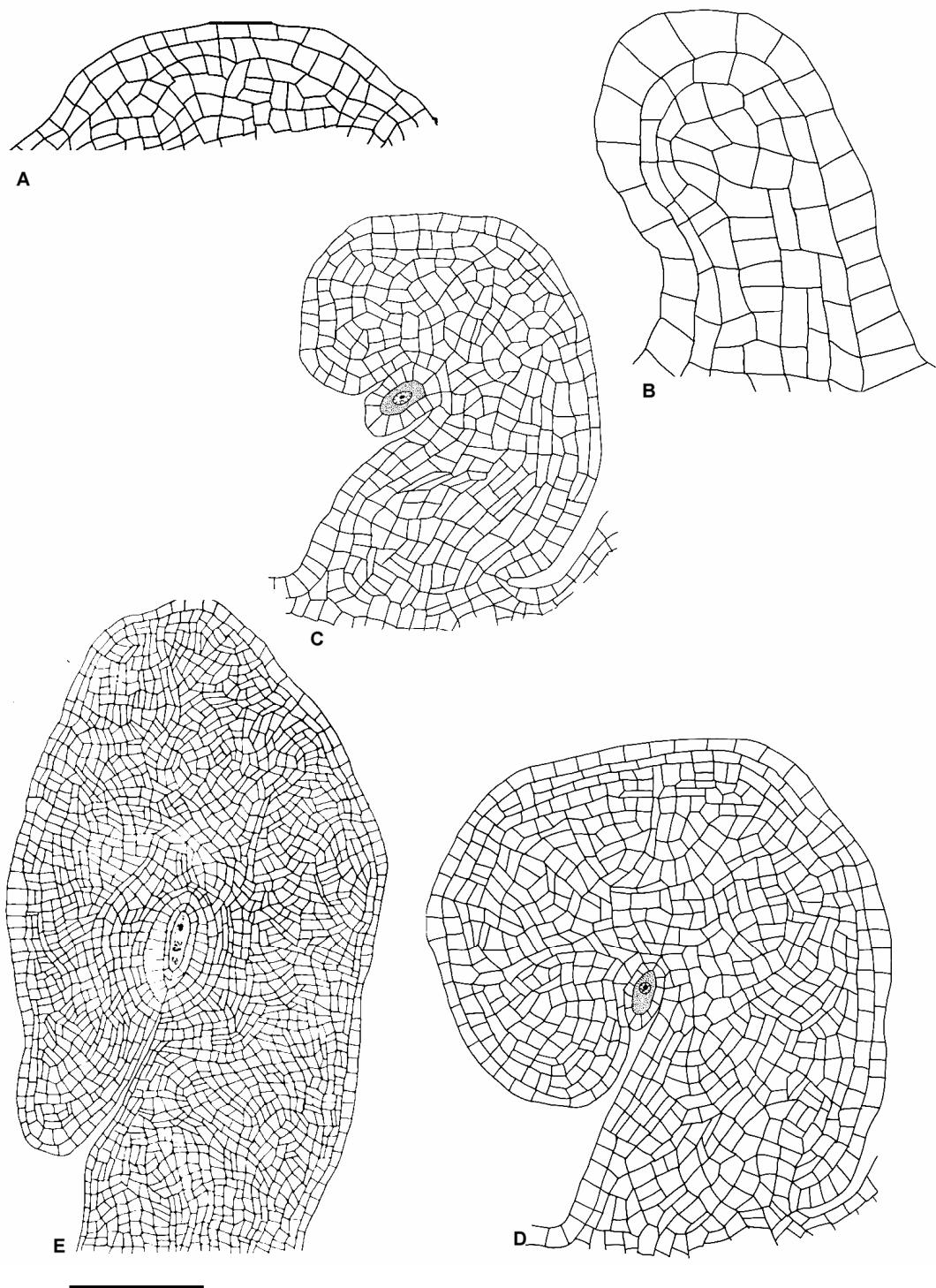


Figura 2. Óvulo. **A)** primeras divisiones que dan lugar al domo. **B)** El primordio ovular comienza a curvarse. **C)** Estadio de célula madre de las megásporas (CMM), el óvulo muestra una curvatura de 90°. **D)** Estadio de CMM más avanzado, el óvulo se encuentra curvado casi 180°. **E)** Estadio de tétrade de megásporas, el óvulo se observa totalmente curvado. *Barra: A: 50 µm; B: 25 µm; C: 27 µm; D: 16 µm; E: 67 µm*

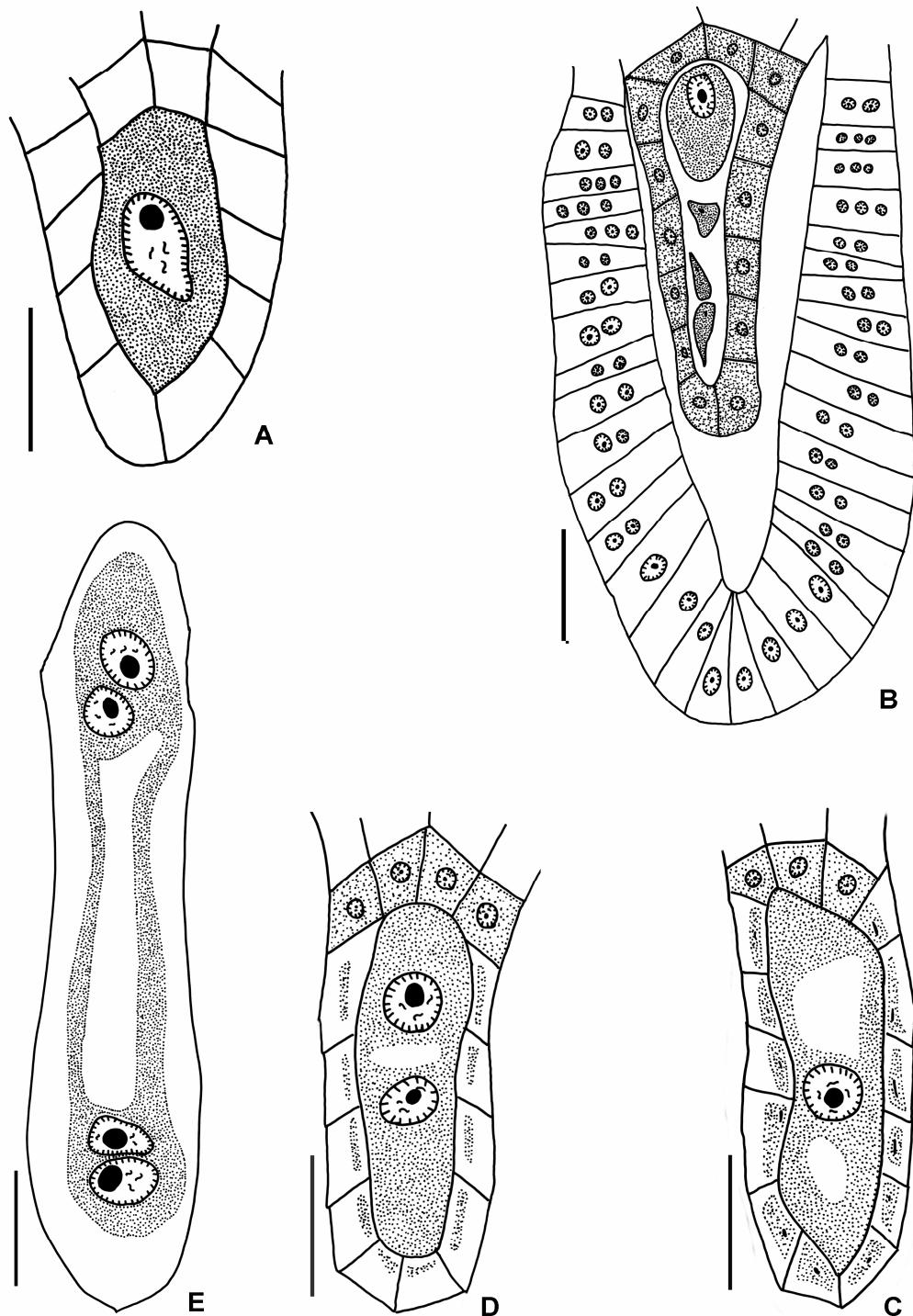


Figura 3. HA 89. A) Célula madre de las megásporas, ovulo tenuinucelado. B) Tétrade de megásporas linear, megáspora calazal funcional y micropilares degenerando, epidermis nucelar, endotelio desarrollado con células 1 a 3-nucleadas. C) Megáspora funcional, nucela en vías de degradación. D) Saco embrionario binucleado, células nucelares algo consumidas. E) Saco embrionario tetranucleado. Barra: 18 μ m

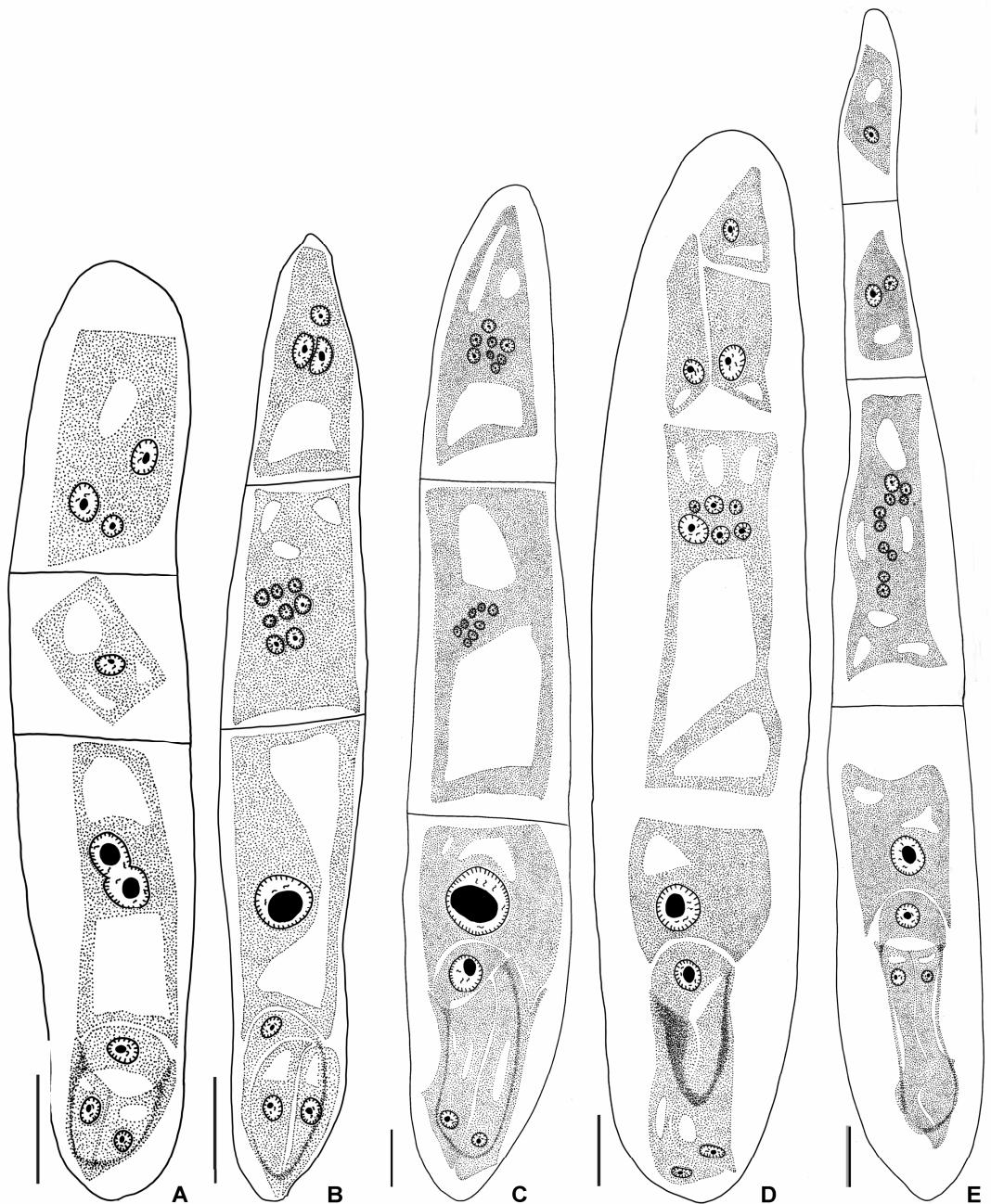


Figura 4. HA 89. **A)** Megagametófito joven, núcleos polares fusionándose, dos antípodas. **B)** Gametófito con núcleos polares fusionados. **C)** Gametófito maduro, núcleos de las sinérgidas en la región micropilar. **D)** Gametófito maduro, ausencia de paredes gruesas separando las cuatro antípodas entre sí y la célula media. **E)** Gametófito maduro con tres antípodas y gruesas paredes entre ellas. *Barra: 18μm*

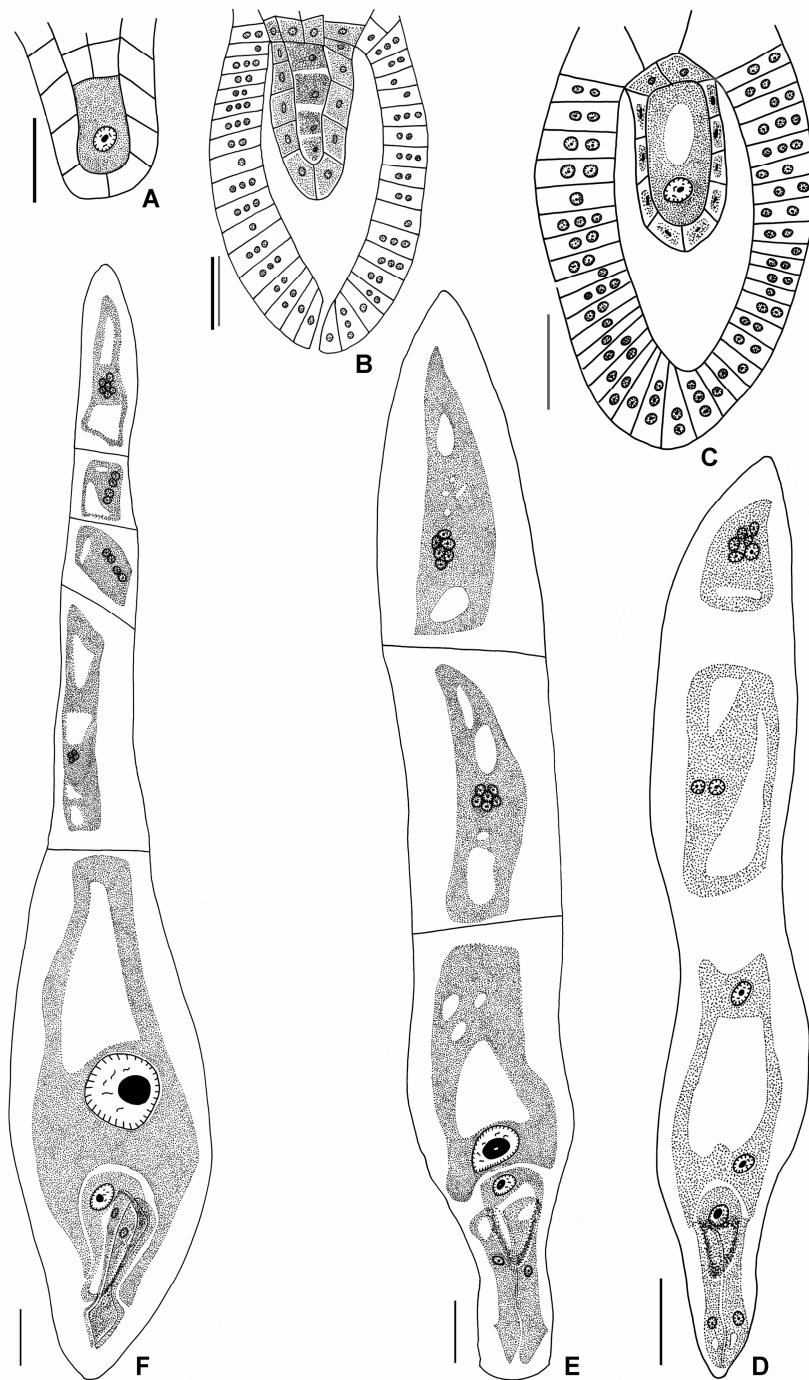


Figura 5. CF 17 y P 30. **A)** Célula madre de las megásporas, óvulo tenuinucelado. **B)** Tétrade de megásporas linear, epidermis nucelar, endotelio desarrollado con células 1 a 3-nucleadas. **C)** Megáspora funcional, nucela parcialmente consumida. **D)** Gametófito joven, núcleos polares no fusionados, ausencia de paredes gruesas separando las antípodas entre sí y la célula media . **E)** Gametófito maduro con dos antípodas y paredes gruesas entre ellas. **F)** Gametófito maduro con cuatro antípodas. *Barra: 18μm*

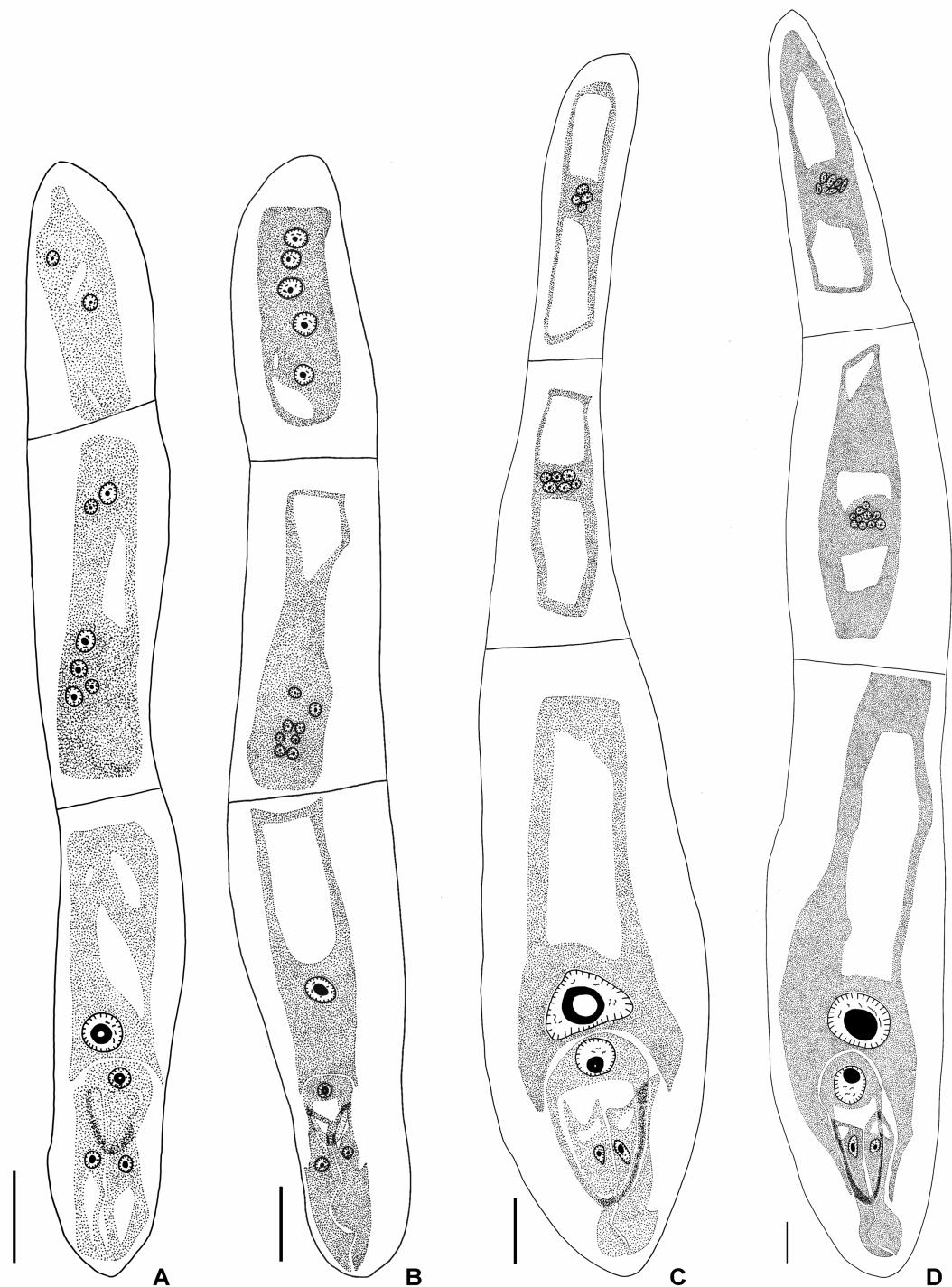


Figura 6. CF 17 y P 30. **A)** Gametófito maduro, sinérgidas con núcleos calazales y vacuolas micropilares. **B)** Gametófito maduro, núcleos de las sinérgidas en el extremo calazal. **C)** Gametófito maduro, núcleo secundario conspicuo con una vacuola nucleolar. **D)** Gametófito maduro, célula media con una gran vacuola, dos antípodas con numerosos núcleos. *Barra: 18μm*

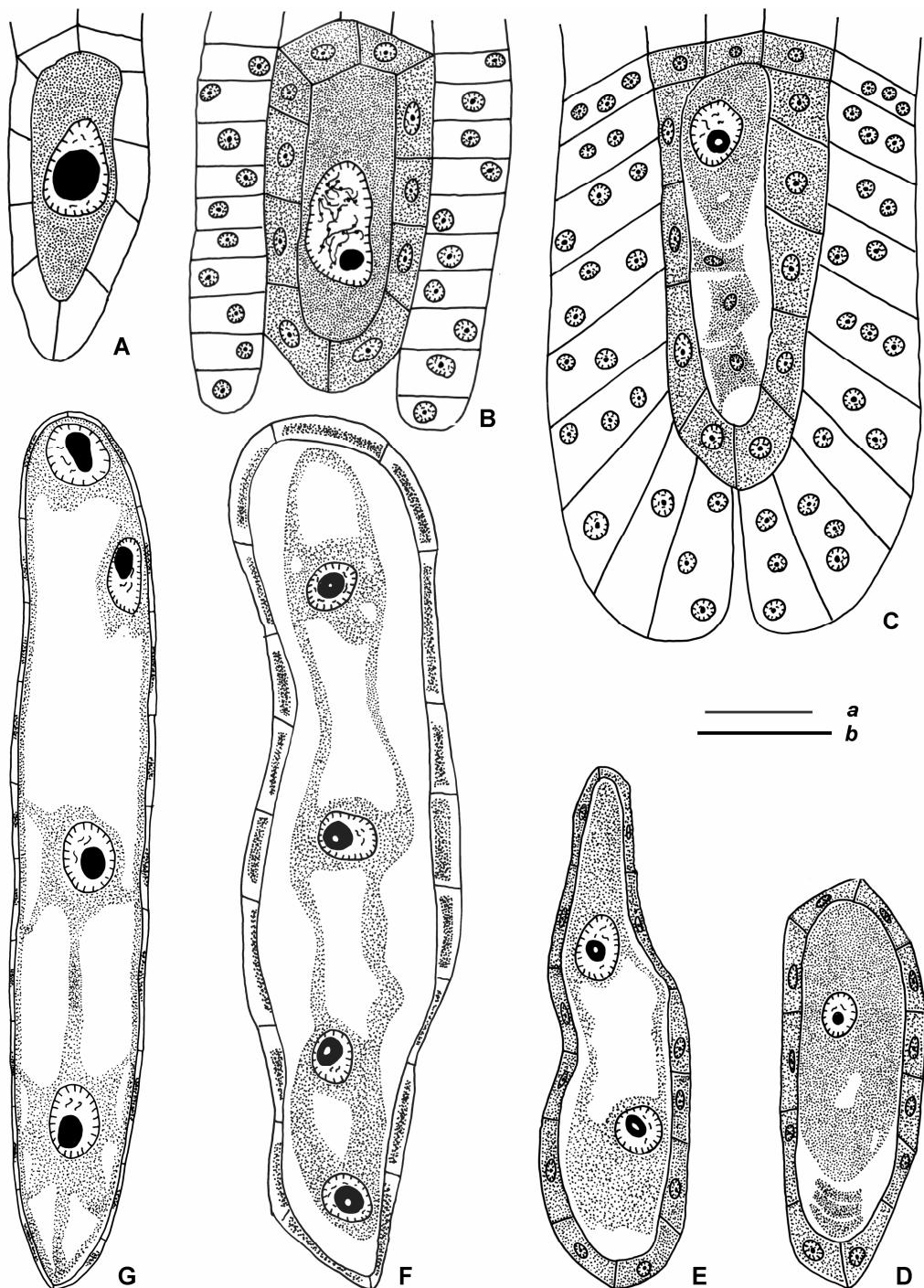


Figura 7. DK 4050. **A)** Célula madre de las megásporas, óvulo tenuinucelado. **B)** Célula madre de las megásporas, epidermis nucelar, endotelio desarrollado con células 1-nucleadas. **C)** Tétrade linear, células del endotelio 1 a 3-nucleadas. **D)** Megáspora funcional y micropilares degenerando. **E)** Gametófito binucleado, nucela todavía presente. **F)** Gametófito tetranucleado, células nucleares parcialmente consumidas. **G)** Gametófito tetranucleado de mayor longitud, células nucleares parcialmente consumidas. *Barras:* 18 μ m; **A-F:** barra *b*; **G:** barra *a*.

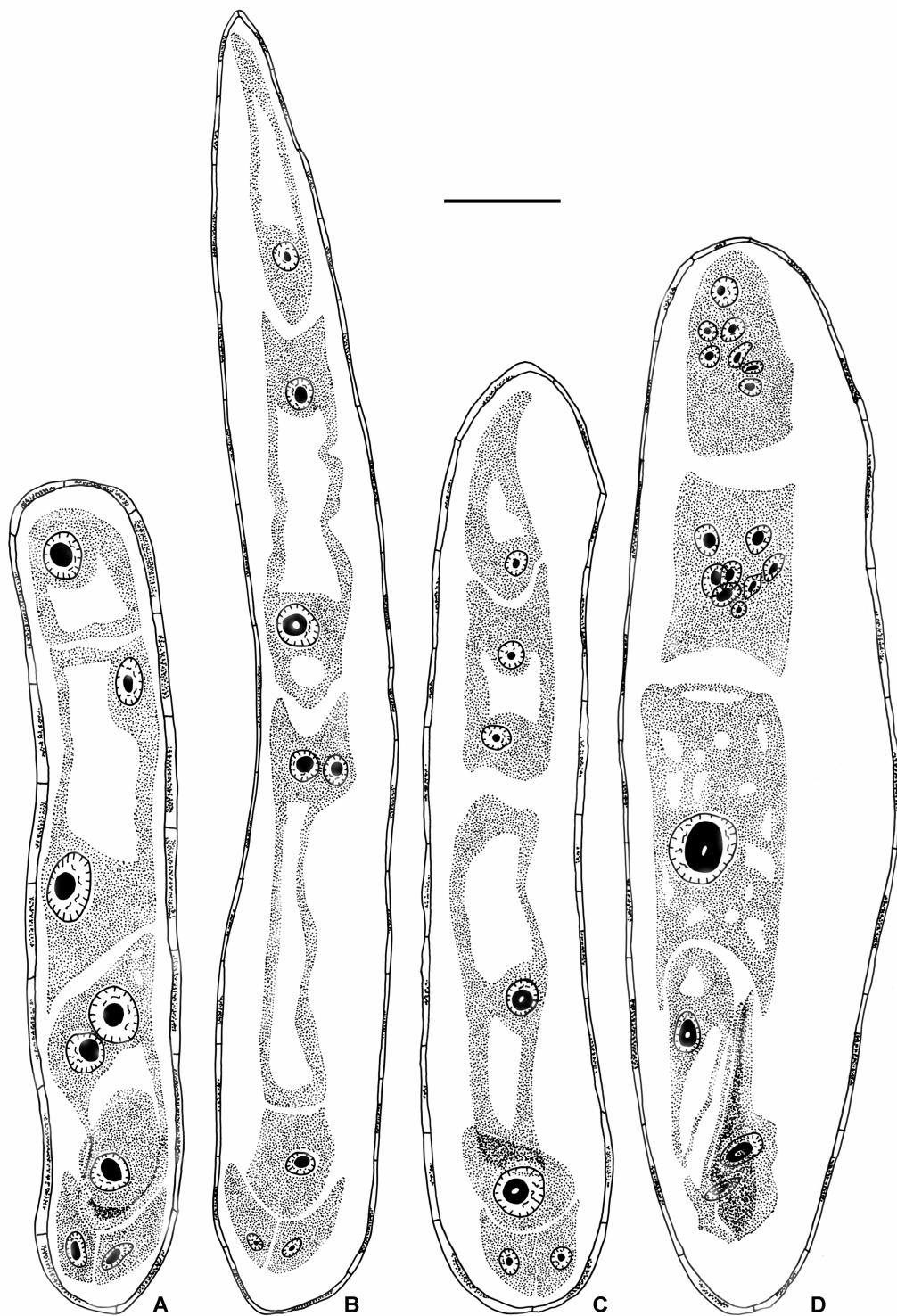


Figura 8. DK 4050. **A)** Gametófito joven, célula central poco desarrollada con ambos núcleos polares, antípoda micropilar con dos núcleos y la calazal con uno solo. **B)** Gametófito joven de mayor longitud, núcleos polares sin fusionarse, antípoda micropilar 2-nucleada y calazal 1-nucleada. **C)** Gametófito con núcleos polares fusionados, dos núcleos en la antípoda micropilar y uno en la calazal. **D)** Gametófito con antípodas multinucleadas, restos de células de la nucela presentes. *Barra: 18μm*

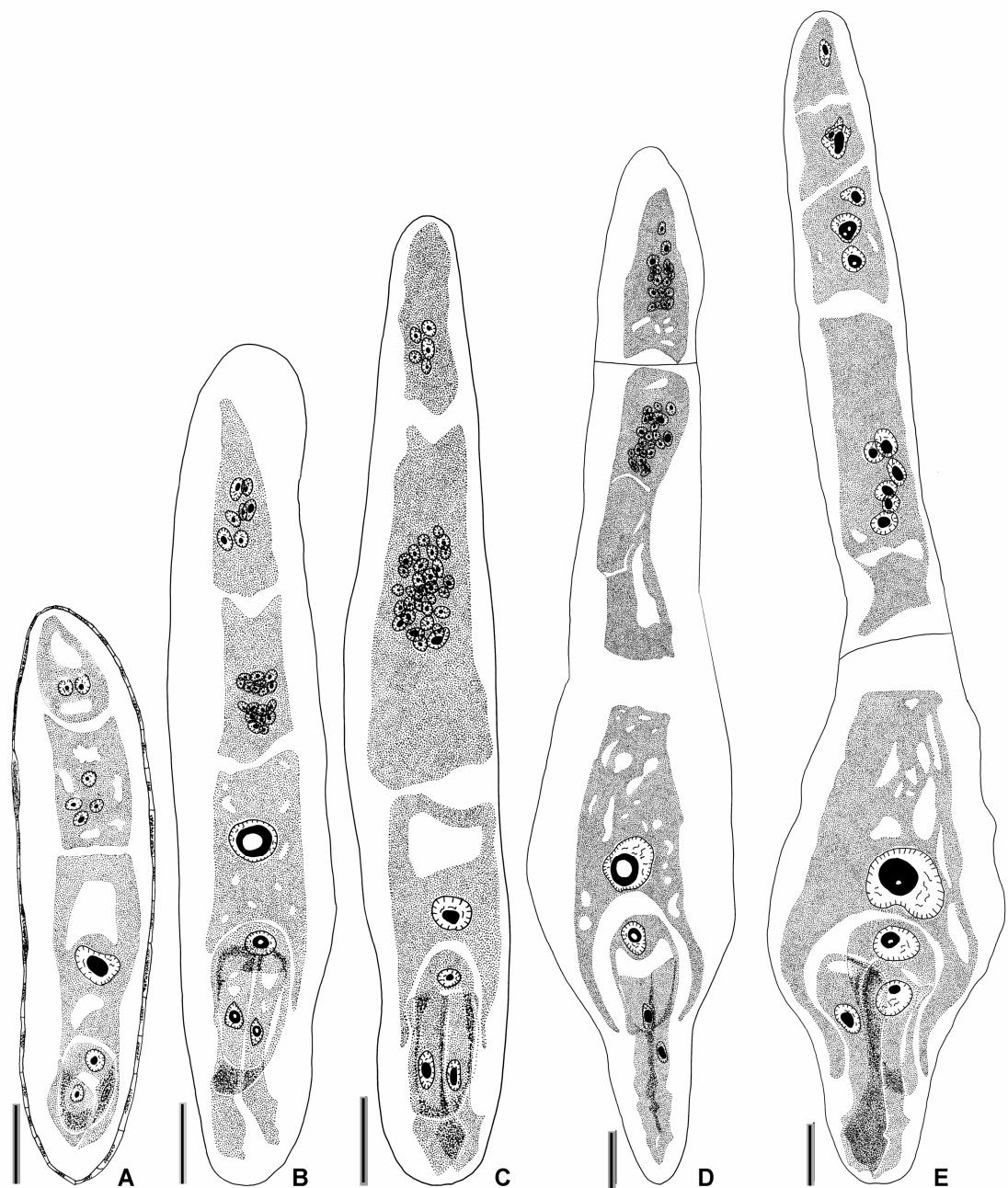


Figura 9. DK 4050. **A)** Gametófito con núcleo polar secundario conspicuo, cuatro núcleos en la antípoda micropilar y dos en la calazal. **B)** Gametófito maduro, nucela completamente ausente, núcleo polar secundario con una vacuola nucleolar. **C)** Gametófito maduro, sinérgidas con núcleos ubicados en el centro de las células, ambas antípodas multinucleadas. **D)** Gametófito maduro, núcleo polar con una vacuola nucleolar, paredes rotundas entre ambas antípodas. **E)** Gametófito maduro, pared rotunda entre la célula media y la antípoda micropilar, cuatro antípodas. *Barra: 18μm*

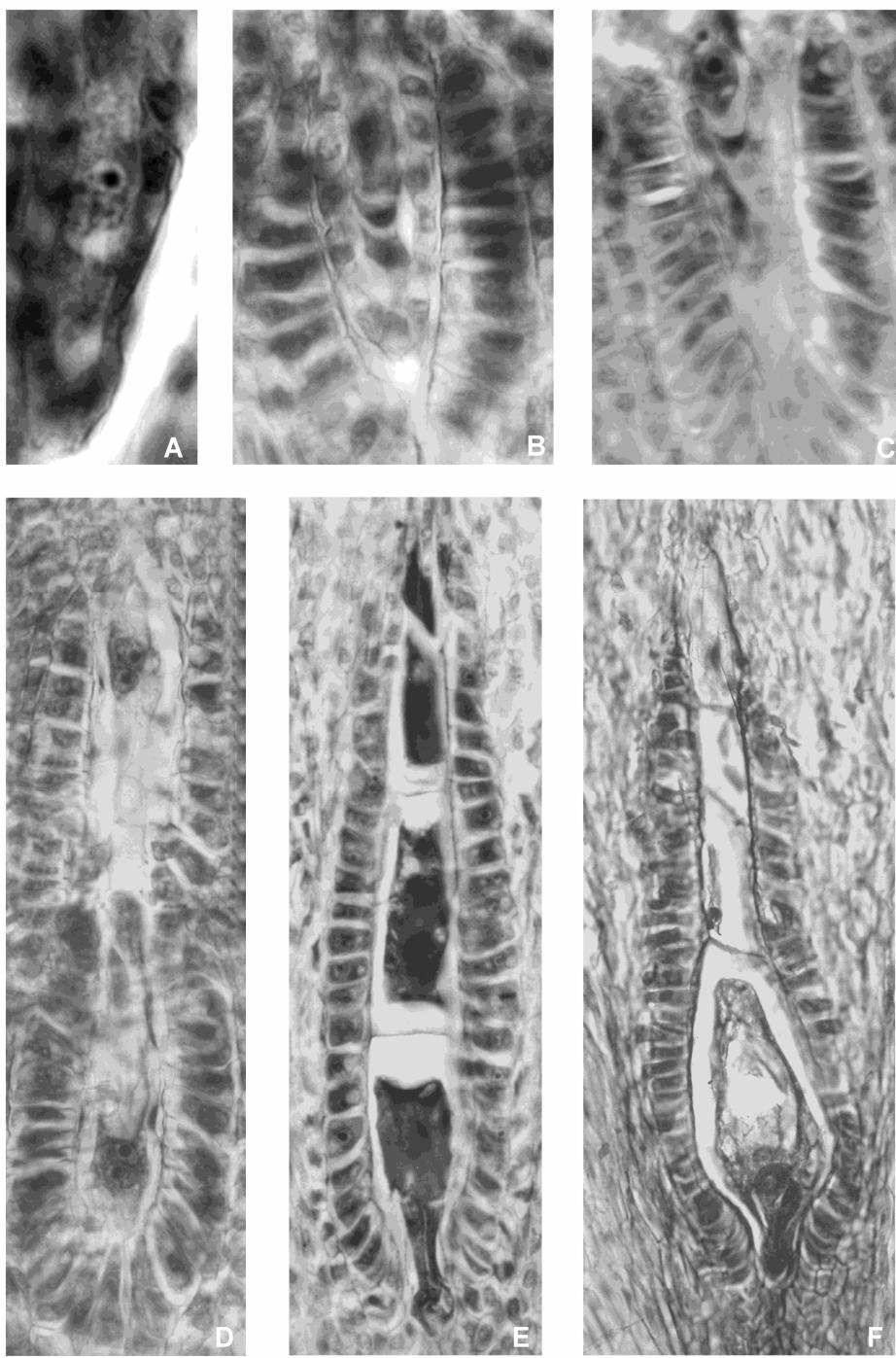


Figura 10. Megasporogénesis y megagametogénesis en CF 17 y P 30. **A)** Célula madre de las megásporas. **B)** Tétrade de megásporas lineal. **C)** Megáspora calazal funcional y micropilares degenerativas. **D)** Gametófito tetranucleado. **E)** Gametófito con tres antípodas y paredes rotundas entre ellas y la célula media. **F)** Gametófito maduro, célula central con una gran vacuola, endotelio rodeando casi todo el gametófito. *Barras: A = 13 μm ; B = 28 μm ; C = 29 μm ; D = 42 μm ; E = 54 μm ; F = 50 μm*

CAPÍTULO V

Estilo y estigma



5.1. Introducción.

Las superficies de los estigmas de las Angiospermas han sido clasificadas como “húmedas” o “secas” basándose respectivamente en la presencia o ausencia de una secreción estigmática copiosa (Heslop-Harrison *et al.*, 1975; Heslop-Harrison y Shivanna, 1977). Raghavan (1997) considera que existe una correlación imprecisa entre la morfología de la superficie estigmática y el monto de secreción presente durante el período receptivo. Hasta el momento son relativamente pocos los ejemplos estudiados y es sabido que existen familias como las Amaryllidaceae, Commelinaceae, Liliaceae, Onagraceae, Rhamnaceae y Rosaceae, que incluyen géneros con ambos tipos de estigma.

Las secreciones de los estigmas húmedos son necesarias para una correcta hidratación y germinación de los granos de polen. Dicha secreción puede ser primariamente rica en lípidos como en las Solanaceae, o rica en carbohidratos como en las Liliaceae (Goldman *et al.*, 1994). Los componentes lipídicos de las secreciones estigmáticas parecerían ser esenciales para la penetración de los tubos polínicos en el estigma y su crecimiento a través del estilo (Lush *et al.*, 1998; Wolters-Art *et al.*, 1998). De hecho, en presencia de dichos lípidos los tubos polínicos son capaces de penetrar hojas cuyas cutículas fueran previamente removidas (Wolters-Art *et al.*, 1998). Lush *et al.* (1998, 2000) sugieren que la función de los lípidos estigmáticos es facilitar el establecimiento de un gradiente de agua dentro de la secreción estigmática que guíe el crecimiento de los tubos polínicos en el estigma. Por lo tanto, inmediatamente después de la germinación, los tubos polínicos se encuentran con un camino cuya concentración

de agua se incrementa desde el estigma hacia el tejido de transmisión del estilo.

Los estigmas secos, que carecen de una secreción copiosa en su superficie, están cubiertos por una cutícula continua que debe ser penetrada enzimáticamente por los tubos polínicos, usando cutinasa para efectuar una exitosa fertilización (Heslop-Harrison *et al.*, 1975; Maiti *et al.*, 1979; Hiscock *et al.*, 1994). Por fuera de la cutícula hay una capa proteica delgada, la película, que puede detectarse indirectamente por su intensa actividad esterasa no específica (Mattson *et al.*, 1974; Heslop-Harrison *et al.*, 1975). Aunque no se conoce con exactitud la función de la película se cree que juega un papel muy importante en el reconocimiento entre el grano de polen y el estigma, ya que, en algunas especies, la remoción de la misma con detergentes impide la penetración de los tubos polínicos en el estigma (Mattson *et al.*, *op cit*; Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1980; Heslop-Harrison *et al.*, *op cit*; Hiscock *et al.*, 1998). Es interesante notar que, a pesar de la naturaleza seca de los estigmas cuticularizados, una superficie lipídica es necesaria para la exitosa hidratación y germinación de los granos de polen junto con factores de reconocimiento proteicos aportados por las complejas cubiertas de los granos de polen (Dickinson, 1993; Dickinson, 1994; Dickinson, 1995; Preuss *et al.*, 1993; Hulskamp *et al.*, 1995; Wolters-Arts *et al.*, 1998). En las Brassicaceae, por ejemplo, cuando un grano de polen llega a la superficie estigmática, una cubierta polínica rica en lípidos es liberada desde la exina hacia el estigma, y establece de este modo un “pie de anclaje” en la zona de contacto entre ambos (Elleman y Dickinson, 1986; Elleman *et al.*, 1992). Durante la hidratación del polen el agua pasa hacia el grano a través del pie de anclaje e inmediatamente el tubo polínico comienza a crecer. Granos de polen estériles de algunos mutantes de *Arabidopsis*, que no producen una cubierta

polínica o son defectuosos en la síntesis de largas cadenas lipídicas específicas, no logran hidratarse en el estigma (Preuss *et al.*, 1993; Hulskaman *et al.*, 1995), indicando que, igual que en las especies de estigmas húmedos, los lípidos son esenciales para el desarrollo del polen en el estigma (Dickinson, 1993; Dickinson, 1994; Wolters-Arts *et al.*, 1998). Notoriamente, los estigmas húmedos han sido correlacionados con un sistema de autoincompatibilidad gametofítica y los estigmas secos con un sistema de autoincompatibilidad esporofítica (Heslop-Harrison, 1975; Heslop-Harrison y Shivanna, 1977), aunque esta correlación tiene excepciones (Nettancourt, 1997).

Heslop-Harrison y Shivanna (1977) describieron como seca la superficie estigmática de especies dentro de Asteraceae, basándose en la observación de 17 especies pertenecientes a distintas tribus. Esta observación se correlaciona con el sistema de autoincompatibilidad esporofítica conocido para las Asteraceae (Gerstel, 1950; Hughes y Babcock, 1950; Hiscock, 2000a). A pesar de la importancia de las Asteraceae como una de las familias más grande de las Angiospermas y como fuente de numerosas especies importantes para la agricultura y la horticultura, solo hay unos pocos estudios detallados de las interacciones polen-estigma.

Knox (1973) mostró que en *Ambrosia* sp., autocompatible, y *Cosmos bipinnatus*, autoincompatible, las polinizaciones compatibles e incompatibles eran seguidas de por una rápida liberación de pollenkitt hacia la superficie estigmática, entre los 10 a 15 minutos anteriores a la germinación y durante la misma. Este material de la pared del grano de polen, compuesto por una diversidad de enzimas, carbohidratos y lípidos, es liberado a través de los poros de la ectexina y los colpos y se cree que tiene un función

clave en los eventos de reconocimiento del polen y el estigma terminando en compatibilidad y/o incompatibilidad (Howlett *et al.*, 1975). La respuesta de autoincompatibilidad en *C. bipinnatus* siempre ocurre en la superficie estigmática, antes o inmediatamente después de la germinación del grano de polen, y es seguida por una deposición de calosa en el tubo polínico naciente (Knox, 1973; Howlett *et al.*, *op cit*). Estas observaciones fueron confirmadas con estudios realizados en *Helianthus* por Vithanage y Knox (1977), quienes además observaron que la superficie estigmática en este género es seca.

Elleman *et al.* (1992) reexaminaron los eventos de polinización en *C. bipinnatus* y *Helianthus annuus* como parte de un estudio de las interacciones polen-estigma en especies de estigma seco. Demostraron que una respuesta secretora del estigma puede acompañar el inicio del crecimiento del tubo polínico inmediatamente después de la polinización. Como consecuencia de esto, Elleman *et al.* (*op cit*) cuestionan si la superficie del estigma de las especies de Asteraceae es enteramente seca o si realmente es parcialmente secretora. Hiscock *et al.* (2002) reexaminaron las interacciones polen-estigma en especies de la familia Asteraceae, prestando especial atención a la naturaleza de la superficie del estigma y la respuesta del mismo a polinizaciones compatibles e incompatibles. Se basaron en una especie altamente autoincompatible, *Senecio squalidus*, ya que forma parte de la base de los estudios moleculares del sistema de autoincompatibilidad esporofítico de las Asteraceae (Hiscock, 2000a, Hiscock, 2000b). Hiscock *et al.* (*op cit*) describen al estigma de *Senecio* como semiseco, ya que está cubierto por una cutícula, una película proteica y una secreción de lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos autores consideran que el estigma semiseco es un carácter general de

la familia.

La ultraestructura de las papilas estigmáticas de diversas especies ha sido estudiada por numerosos autores, que encontraron en ellas presencia preponderante de mitocondrias, plástidos, retículo endoplasmático, dictiosomas, ribosomas y vesículas (Konar y Linskens, 1966; Vasil'ev, 1970; Dickinson y Lewis, 1973; Dumas *et al.*, 1978; Sedgley y Buttrose, 1978; Herrero y Dickinson, 1979; Clarke *et al.*, 1980; Herd y Beadle, 1980; Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1980; Tilton & Horner, 1980; Wilms, 1980; Heslop-Harrison, *et al.*, 1981; Sedgley, 1981; Uwate y Lin, 1981; Dickinson *et al.*, 1982; Owens y Horsfield, 1982; Ciampolini *et al.*, 1983; Jobson *et al.*, 1983; Sedgley y Blesing, 1983; Cresti *et al.* 1986; Kandasamy *et al.*, 1989; Bystedt, 1990; Wróbel y Bednarska, 1994).

La morfología y anatomía del estilo es muy variable y se han descripto tres tipos básicos hasta la actualidad para las Angiospermas, sólido, semisólido y hueco (Vasil y Johri, 1964; Vasil, 1974). Diversos trabajos ultraestructurales han estudiado las características de las paredes del tejido de transmisión en el estilo de algunas especies de Angiospermas (Sassen, 1974; Bell y Hicks, 1976; Cresti *et al.*, 1976; Johri, 1984; Raghavan, 1997). Este tejido, en los estilos sólidos, puede tener un arreglo más o menos laxo o una estructura más compacta. En *Gossypium*, todas las células presentan una pared gruesa estructurada en capas. La parte más interna consiste de pectinas y hemicelulosas, la capa media tiene una predominancia de hemicelulosa y la tercera capa es rica en sustancias pécticas y pobre en hemicelulosa y celulosa. La laminilla media, considerada como la cuarta capa, es fibrosa, con gran cantidad de sustancias pécticas y

algo de hemicelulosa (Jensen y Fisher 1969).

Las células del tejido de transmisión contienen numerosas mitocondrias, plástidos, retículo endoplasmático rugoso, dictiosomas y ribosomas libres. La sustancia intercelular en muchas plantas de estilo sólido se encuentra compuesta por carbohidratos, proteínas, glicoproteínas y algunas enzimas como las ácidofosfatasas, peroxidases y esterasas (Pandey, 1997).

Yan *et al.* (1991) encontraron tejido transmisor en la micrópila del óvulo de girasol en un estudio de la ultraestructura del mismo antes y después de la fertilización. Sin embargo, no hacen referencia al estilo ni al estigma.

En el presente estudio se analiza la ultraestructura del estigma y del estilo antes, durante y después de la antesis y se comparan las observaciones realizadas con aquéllas efectuadas por Yan *et al.* (1991) en el óvulo.

5.2. Resultados.

El presente capítulo expone resultados de estudios realizados en el híbrido DK 4050, en condiciones de polinización libre.

5.2.1. Estigma y estilo.

El estigma es bífido y no presenta secreción copiosa al momento de la antesis. Las papilas son unicelulares (Figs. 1A-C, 2A-C, 5E, F, 7C, D, 8A, C). Poseen núcleos conspicuos con dos nucleolos (Figs. 2A, B, 3B, 6A) y paredes primarias gruesas, revestidas por una delgada cutícula que se tiñe positivamente con Sudan Black B y una película de naturaleza proteica que se tiñe positivamente con Azul Brillante de Coomassie. Esta última se diferencia de la primera, observada con microscopio electrónico de transmisión, como una fina capa de mayor electrodensidad. La pared se observa diferenciada en dos zonas de similar espesor, una interna con moderada electrodensidad y una externa de mayor densidad electrónica (Figs. 4A, 6B). Antes de la antesis, estas células se encuentran muy vacuolizadas y poseen mitocondrias, gran cantidad de plastos con granos de almidón, abundante retículo endoplasmático rugoso, numerosos dictiosomas y algunos glóbulos lipídicos (Fig. 3 A-C). Se observa gran cantidad de plasmodesmos que conectan a las papilas entre sí en su porción basal y a éstas con las células subepidérmicas (Figs. 3B-D, 4B).

Al momento de la antesis, los granos de polen inician el crecimiento del tubo polínico sobre las papilas estigmáticas. En este estadio se observa una disminución de la cantidad de retículo endoplasmático y dictiosomas. Por el contrario, aumenta el número de mitocondrias, glóbulos lipídicos y plástidos, que a su vez, tienen más gránulos de almidón (Fig. 6A). Los plasmodesmos que conectan a las papilas entre sí en su región basal continúan observándose.

El estilo consta de afuera hacia adentro de: epidermis, parénquima cortical y tejido de transmisión (Figs. 1D, 2D, 5A, 7A). Es sólido en su porción media e inferior, dado que en la zona superior, próxima al estigma, las dos ramas estilares no se fusionan completamente, dejando una pequeña abertura en el centro del tejido de transmisión (Figs. 5D, 7B, 9A). Por lo tanto, en la porción superior, se puede definir como de tipo semisólido.

La epidermis está constituida por células de paredes levemente engrosadas, muy vacuolizadas y con cutícula gruesa (Fig. 5A, 7A). En el parénquima cortical se distinguen dos haces vasculares perifloemáticos (Fig. 5C) y un canal secretor esquizógeno (Fig. 5B). Las células poseen paredes delgadas y se encuentran muy vacuolizadas (Figs. 1D, 2D).

El tejido transmisor se ubica subepidérmicamente a la altura de las papillas estigmáticas y, en el estilo, en su región central (Figs. 1A-C, 2A, B, 5D-F, 7B-D, 8A-D). El tejido transmisor está compuesto por células isodiamétricas en corte transversal (Figs. 4C, 5D, 6C, 7B, 8 A-B) y alargadas, de extremos mas o menos aguzados, en corte longitudinal (Figs. 1A, B, 5E, F, 7C, D, 8A-D). Antes de la antesis, las células que forman este tejido presentan un citoplasma más o menos denso, con numerosas organelas. Entre estas últimas se distinguen plástidos que contienen uno o más granos de almidón en su interior, dictiosomas con gran cantidad de vesículas rodeándolos y abundante retículo endoplasmático rugoso (Fig. 4C, D). La laminilla media se encuentra algo ensanchada, particularmente en los ángulos y presenta moderada a baja electrodensidad. La pared tiene un aspecto fibrilar y posee en algunos

sectores suaves evaginaciones hacia el citoplasma celular, lo cual confiere a estas células características de “transfer cells”. Durante la antesis, la delgada pared primaria se visualiza más nítidamente, dado que la sustancia intercelular aparece aún más dilatada que en el estadio anterior, y con aspecto amorfo y baja electrodensidad (Fig. 6C). En este estadio se pueden observar gran cantidad de mitocondrias y algunos dictiosomas en las células que forman el tejido de transmisión (Fig. 6D).

Una vez ocurrida la polinización, los tubos polínicos inician su recorrido a través de la laminilla media o sustancia intercelular del tejido de transmisión. En este estadio (antesis) y principalmente en los posteriores (post-antesis), muchas de las células del tejido transmisor se observan muy vacuolizadas, con el citoplasma confinado a la periferia de las mismas y un número menor de organelas, entre las que se encuentran plástidos y glóbulos lipídicos. La sustancia intercelular, en post-antesis, se observa más electrodensa y un poco menos distendida que en el estadio anterior (Fig. 9A-B).

5.2.2. Tejido de transmisión en el óvulo.

La micrópila es cerrada y la epidermis interna del tegumento está muy cutinizada y se encuentra en contacto íntimo con el ápice del óvulo. El tegumento en la zona que delimita la micrópila presenta mayor número de capas celulares del lado próximo al funículo. La micrópila de los óvulos de flores en antesis presenta, en las células que limitan el canal, una matriz intercelular que reacciona de una manera

distintiva con los colorantes. La tinción diferencial de este tejido es semejante a la observada en el estilo y el estigma, y permite identificarlo como tejido de transmisión. La presencia de este tejido transmisor en el óvulo es común a todos los híbridos estudiados. Este tejido comienza a observarse en el óvulo luego de pasados unos 40 minutos de la polinización y se prolonga hasta los primeros estadios de la embriogénesis (Figs. 10 A-C). Se observaron tubos polínicos creciendo a través del tejido de transmisión micropilar.

5.3. Discusión.

El estigma de *Helianthus annuus* no presenta signos de secreción copiosa, por lo que se trata de un estigma de tipo seco, tal cual había sido descripto hasta el momento para otras especies de la familia Asteraceae (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977; Heslop-Harrison, 1981) y para el mismo género por Vithanage y Knox (1977). Elleman *et al.* (1992) cuestionan si la superficie del estigma de las especies de Asteraceae es enteramente seca o si es parcialmente secretora, tras encontrar una respuesta secretora del estigma directamente después de la polinización en *Cosmos bipinnatus* y *Helianthus annuus*. Hiscock *et. al* (2002) describen al estigma de *Senecio squalidus* (Asteraceae) como semiseco y anticipan que puede ser un carácter común a toda la familia. Sin embargo, en los híbridos de *Helianthus annuus* estudiados en el presente trabajo no se observó la secreción que estos autores describen como compuesta por lípidos, carbohidratos y proteínas que los autores mencionan. Lo observado se asemeja más a

una película proteica por fuera de la cutícula como es conocido para las especies de estigma seco (Mattson *et al.*, 1974, Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1980; Heslop-Harrison *et al.*, 1984; Hiscock *et al.*, 1998).

La naturaleza de las paredes de las papilas estigmáticas es muy diversa. Dickinson y Lewis (1973) consideran que la pared de las papilas presenta una estructura en capas. Según Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (1980) pueden existir vesículas proteicas incluidas dentro de ella. En las papilas de girasol se diferencian dos capas con distinta densidad electrónica que concuerdan con lo descripto para *Secale cereale* (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1980) y para *Zea mays* (Heslop-Harrison *et al.*, 1984).

Antes de la antesis se observa gran cantidad de retículo endoplasmático en el citoplasma de las papilas estigmáticas del girasol. Esta organela ha sido relacionada con la formación de vesículas secretoras que llevan fluido glandular lipofílico (Dumas, 1973).

Las células del tejido de transmisión del girasol presentan un citoplasma periférico con numerosos plástidos con gránulos de almidón, algunas mitocondrias, dictiosomas y varios glóbulos lipídicos. De acuerdo a lo observado hasta el momento para diversas especies, las células del tejido transmisor del estilo son metabólicamente muy activas, con abundante cantidad de ribosomas, mitocondrias, retículo endoplasmático, dictiosomas y amiloplastos (Raghavan, 1997).

Las paredes de las células del tejido transmisor del girasol están muy especializadas. Poseen suaves invaginaciones revestidas por la membrana plasmática, lo cual recuerda a las células “transfer” descriptas por Gunning y Pate (1969). Estudios realizados en las células “transfer” del xilema de trigo y en las células “transfer” del endosperma de maíz demostraron que la organización de las microfibrillas en estos engrosamientos de pared es similar a la encontrada en la pared secundaria (Talbot *et al.*, 2007). Sin embargo, las invaginaciones de las paredes de las células del tejido transmisor de *Helianthus annuus* no presentan una electrodensidad diferente a la de la pared primaria. Por lo tanto, es poco probable que las células del tejido transmisor del estilo de los híbridos estudiados en el presente trabajo presenten paredes de tipo secundario.

La sustancia intercelular observada para ésta y otras especies se cree que es de naturaleza amorfa, con una base mucilaginosa, carbohidratos, proteínas, compuestos fenólicos y taninos (Raghavan, 1997). Esta matriz mucilaginosa permite el crecimiento de los tubos polínicos y sirve como guía a los mismos (Clarke *et al.*, 1977).

Yan *et al.* (1991) estudiaron la ultraestructura de la micrópila en relación al crecimiento del tubo polínico y la degradación de una de las sinérgidas. Sus observaciones son similares a las presentadas en este trabajo. Estos autores mencionan la presencia de un tejido transmisor en la micrópila y una matriz intercelular producida por las células epidérmicas del tegumento. Describen las células próximas al funículo y adyacentes a la micrópila como similares a las células del tejido transmisor, con gran cantidad de matriz intercelular, abundantes dictiosomas, retículo endoplasmático rugoso y granos de almidón, todo lo cual conforma un ambiente óptimo para el crecimiento del

tubo polínico. Las células distales al funículo son ricas en retículo endoplasmático rugoso y cuerpos lipídicos, y carecen de espacios intercelulares grandes.

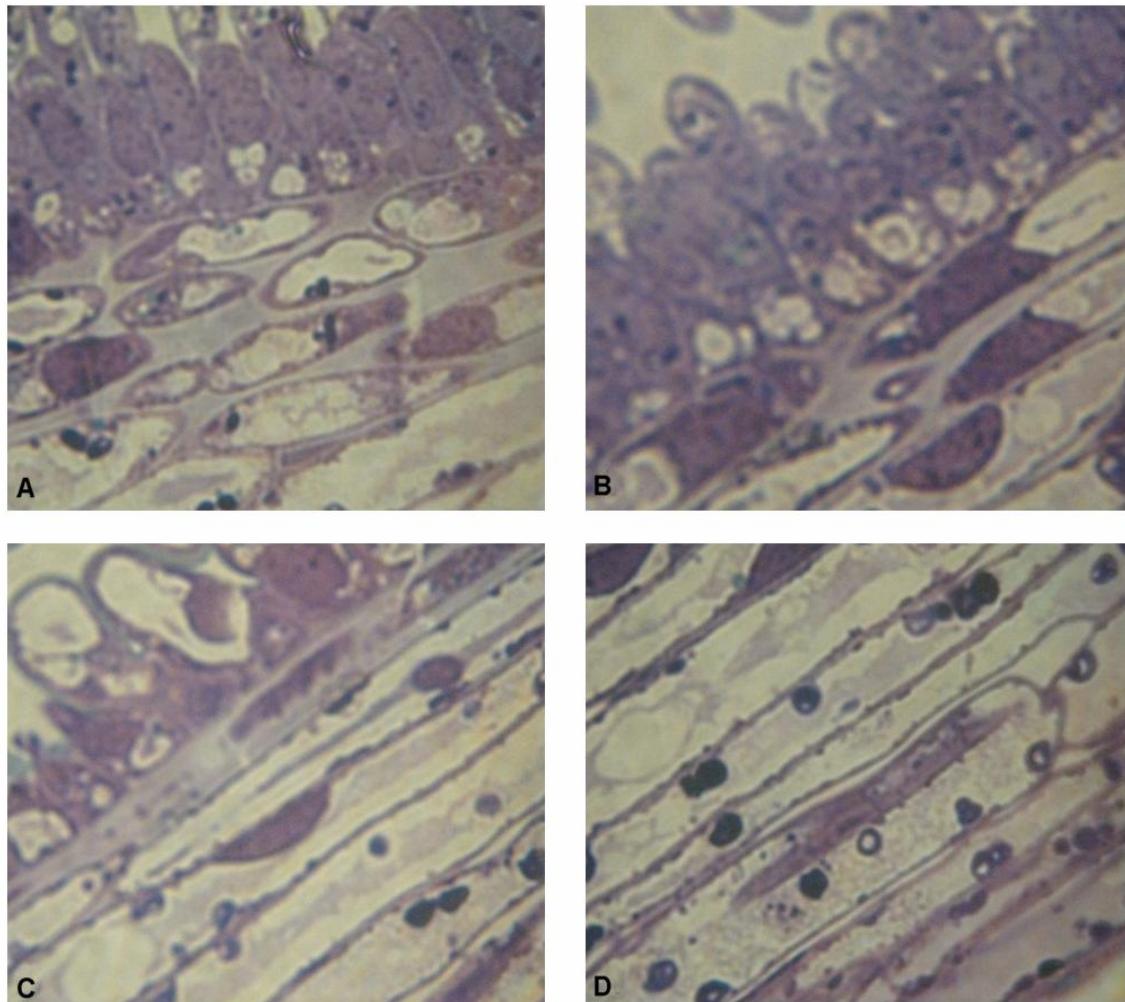


Figura 1. Fotos con microscopio óptico (MO). Preantesis. **A-C**) Corte longitudinal a la altura del estigma, papillas y tejido transmisor subepidérmico. **D**) Detalle del parénquima cortical del estilo. *Barra: 11 µm.*

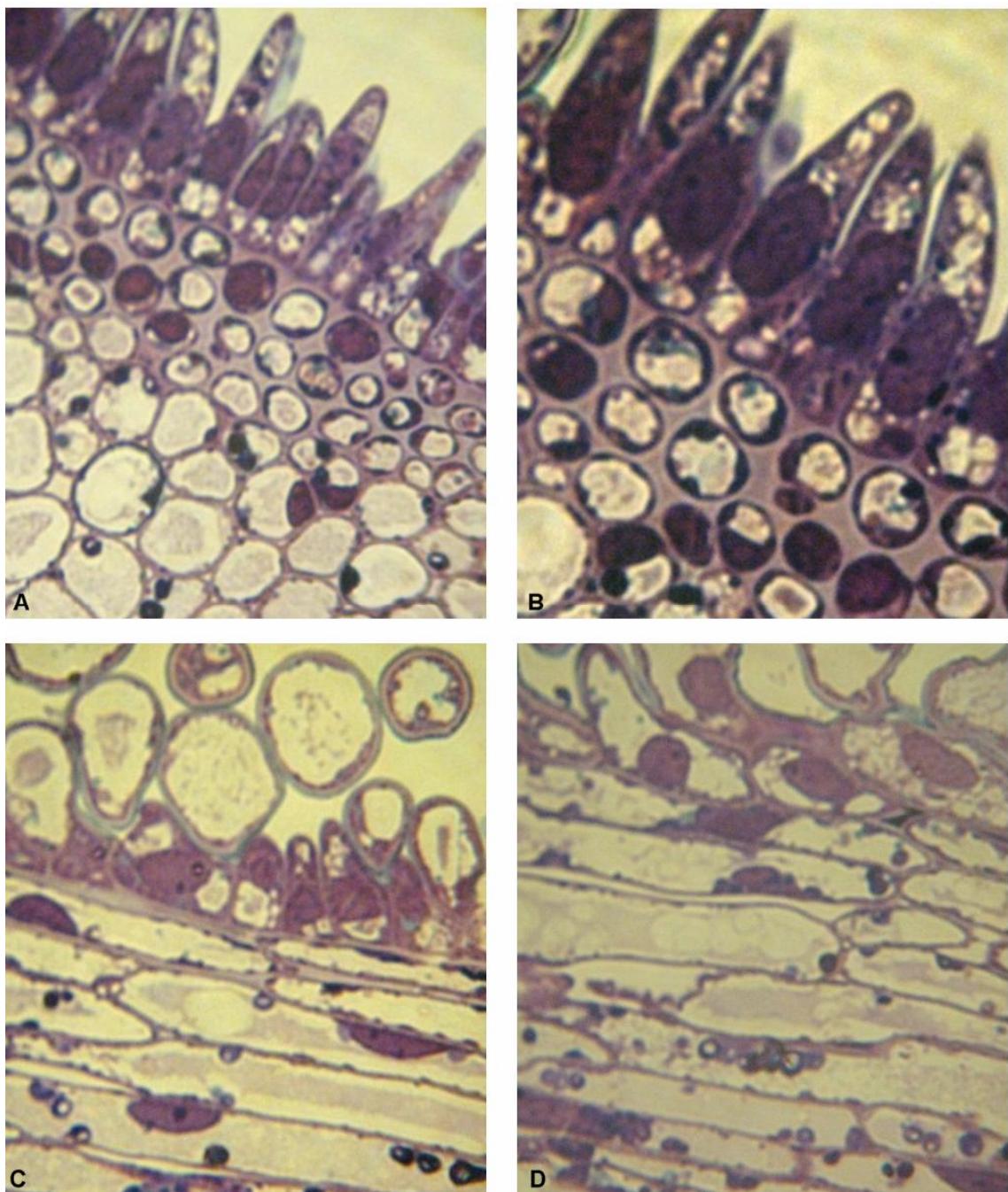


Figura 2. Fotos con MO. Preantesis **A)** Corte transversal del estigma. **B)** Detalle del tejido de transmisión y las papilas. **C)** Corte longitudinal por debajo de las papilas estigmáticas. **D)** Detalle del parénquima. *Barra:* **A:** 11 μm ; **B:** 6 μm ; **C:** 15 μm ; **D:** 18 μm .

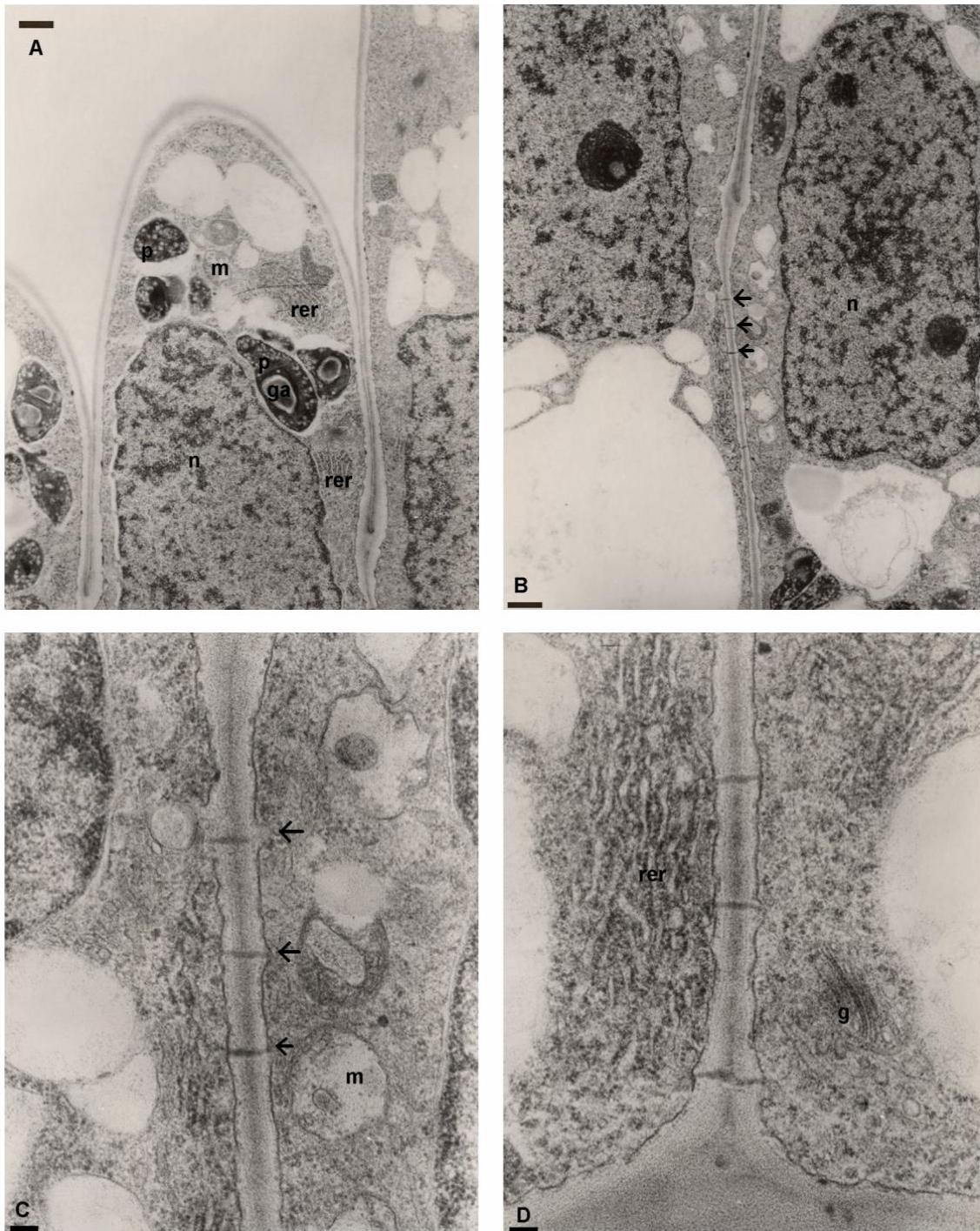


Figura 3. Fotos con microscopía electrónica de transmisión (MET). **A)** Aspecto general de las papilas en corte longitudinal, plástidos (p) con gránulos de almidón (ga), mitocondrias (m), núcleo y retículo endoplasmático rugoso (rer). **B)** plasmodesmos (flechas) entre dos papilas. **C)** Detalle de plasmodesmos (flechas), mitocondrias (m). **D)** Abundante retículo endoplasmático rugoso (rer), aparato de Golgi (g). Barra: **A, B:** 1 μ m; **C, D:** 200 nm.

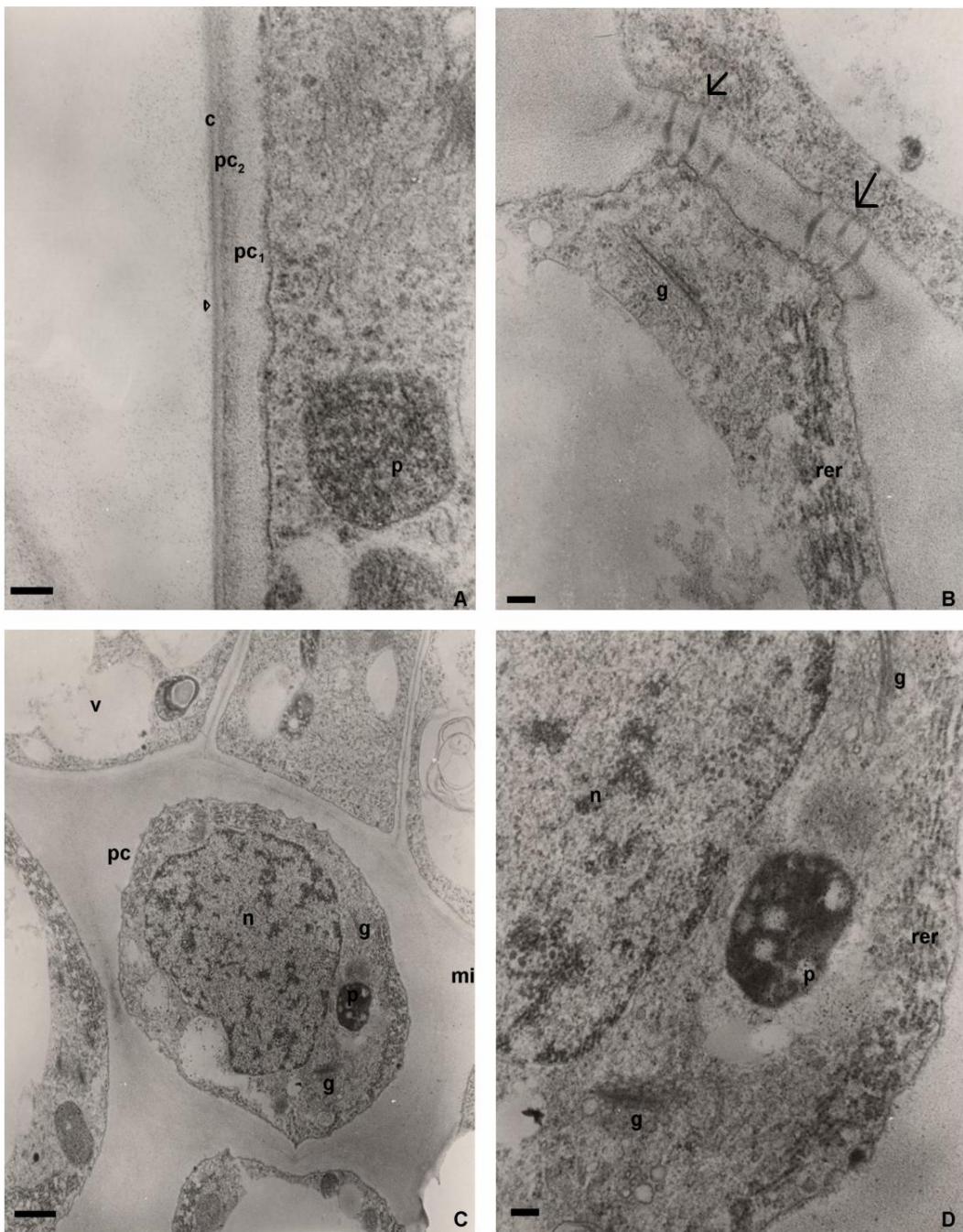


Figura 4. Fotos con MET. Preantesis. **A)** Detalle de la pared de la papila con dos electrodensidades distintas (pc₁, pc₂), cutícula (c) y película proteica (punta de flecha), plástidos (p) en la papila. **B)** Corte transversal de la zona de contacto entre una papila y una célula del tejido transmisor, plasmodesmos (flecha), retículo endoplasmático rugoso (rer) y aparato de Golgi (g). **C)** Aspecto general en corte transversal del tejido de transmisión, pared celular (pc), núcleo (n), aparato de Golgi (g), plástido (p), vacuola (v) y matriz intercelular (mi). **D)** Detalle del citoplasma de una célula del tejido transmisor, plástidos (p), rer, aparato del Golgi (g), núcleo (n). *Barra: A, B, D: 200 nm, C: 1 μm*

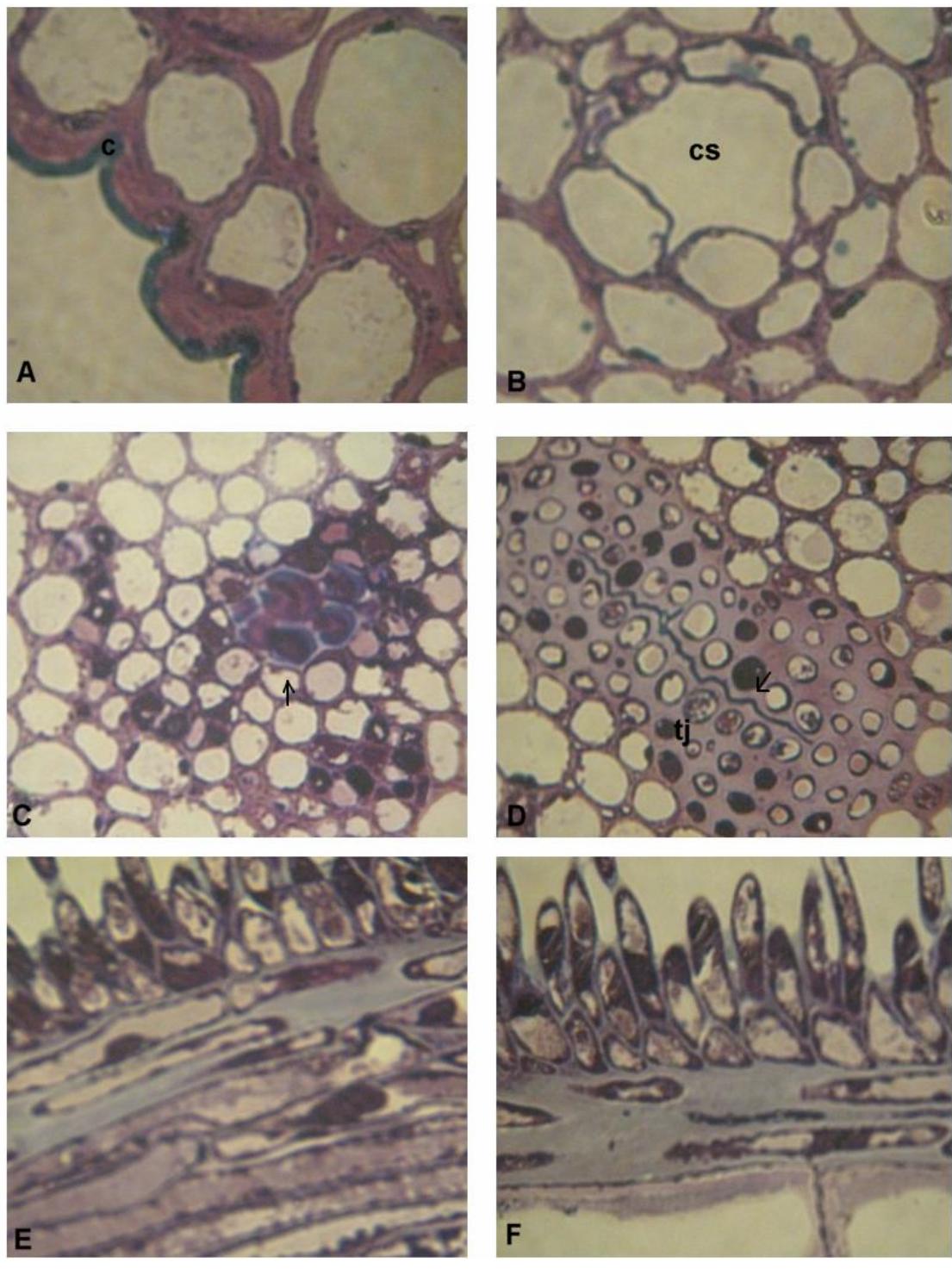


Figura 5. Fotos con MO. Antesis. **A-D.** Corte transversal del estilo. **A)** Detalle de la epidermis estilar con gruesa cutícula (c). **B)** Canal secretor (cs) en el parénquima cortical del estilo. **C)** Haz vascular perifloemático (flecha). **D)** Tejido de transmisión (tj) y zona de unión entre las dos ramas estilares (flecha). **E-F.** Corte longitudinal del estigma. **E)** Papilas y tejido de transmisión. **F)** Detalle de las papilas.

Barra: A, B: 12 μm ; C: 18 μm ; D, E: 15 μm ; F: 11 μm .

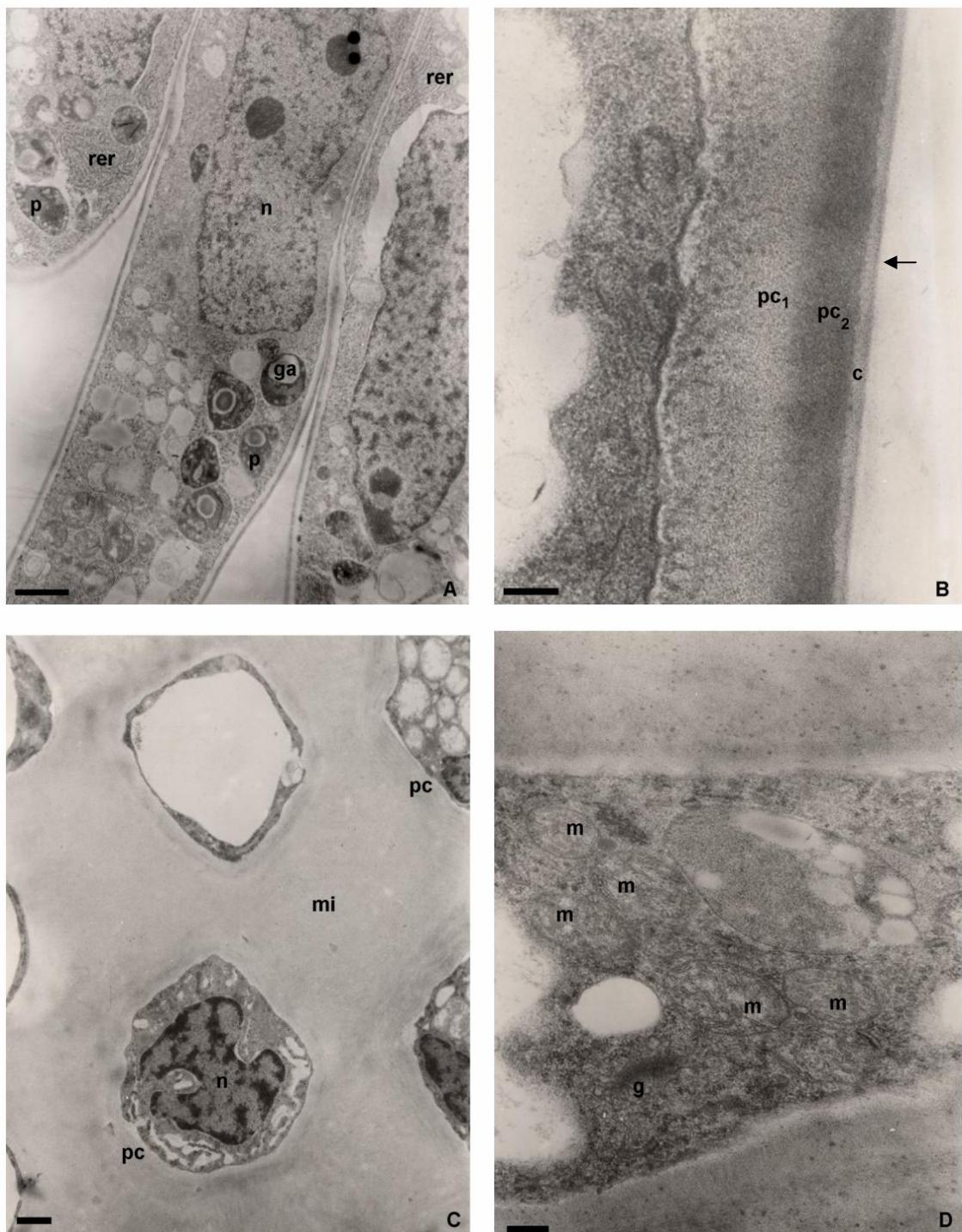


Figura 6. Fotos con MET. Antesis. **A-B.** Corte longitudinal de las papilas estigmáticas. **A)**. Aspecto general de las papilas, plástidos (p) con gránulos de almidón (ga), rer, núcleo (n). **B)** Detalle de la pared de la papila, con dos electrodensidades distintas (pc₁ y pc₂), cutícula (c) y una película proteica (flecha). **C-D.** Corte transversal del tejido de transmisión. **C)** Tejido de transmisión, matriz intercelular (mi), pared celular (pc) y núcleo (n). **D)** Detalle del citoplasma con numerosas mitocondrias (m) y aparato de Golgi (g). *Barra: A: 2 μm, B: 200 nm, C: 1 μm, D: 500 nm.*

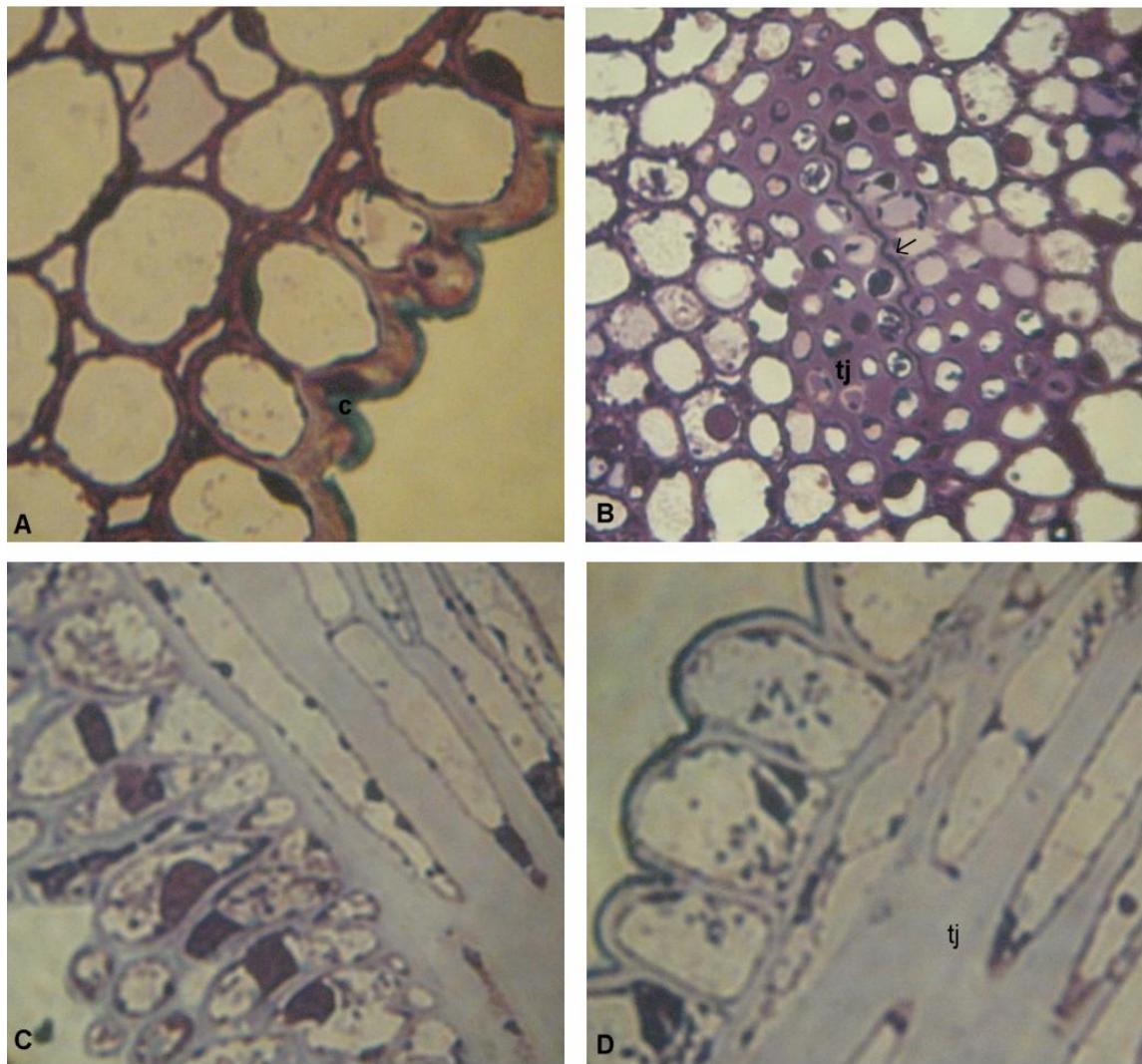


Figura 7. Fotos con MO. Post-antesis. **A-B.** Corte transversal del estilo. **A)** Parénquima cortical y epidermis con cutícula (c). **B)** Tejido de transmisión (tj) y zona de unión entre ambas ramas estilares (flecha). **C-D.** Corte longitudinal del estigma. **C)** Papillas estigmáticas. **D)** Detalle de tejido de transmisión (tj). *Barra: A: 13 µm; B: 14 µm; C: 11 µm; D: 6 µm*

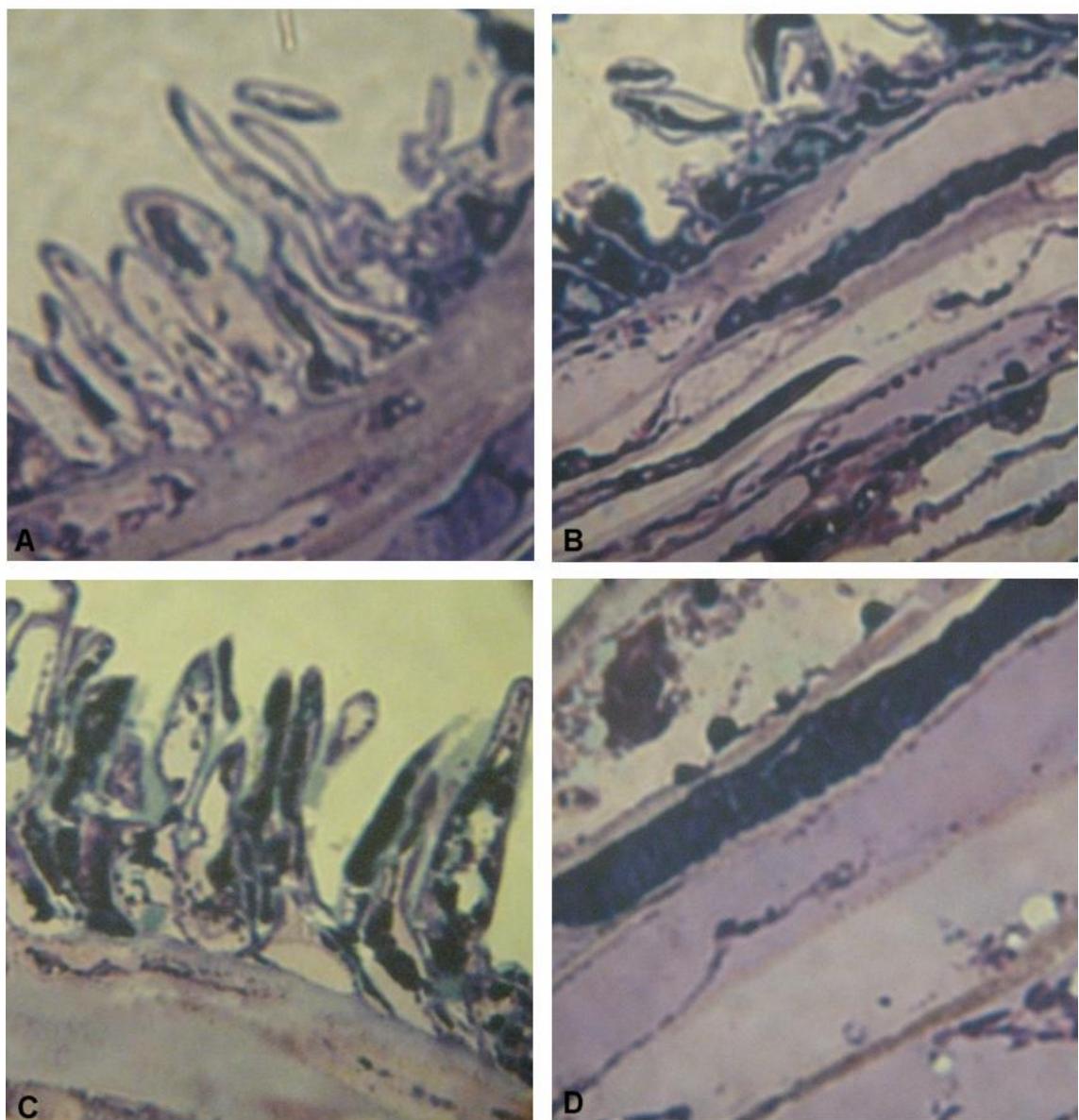


Figura 8. Fotos con MO. Postantesis. Corte longitudinal del estigma. **A)** Papillas estigmáticas. **B)** Tejido de transmisión. **C)** Detalle de papillas estigmáticas. **D)** Detalle de tejido de transmisión. *Barra:* **A:** 15 μm ; **B:** 11 μm ; **C:** 8 μm ; **D:** 6 μm .

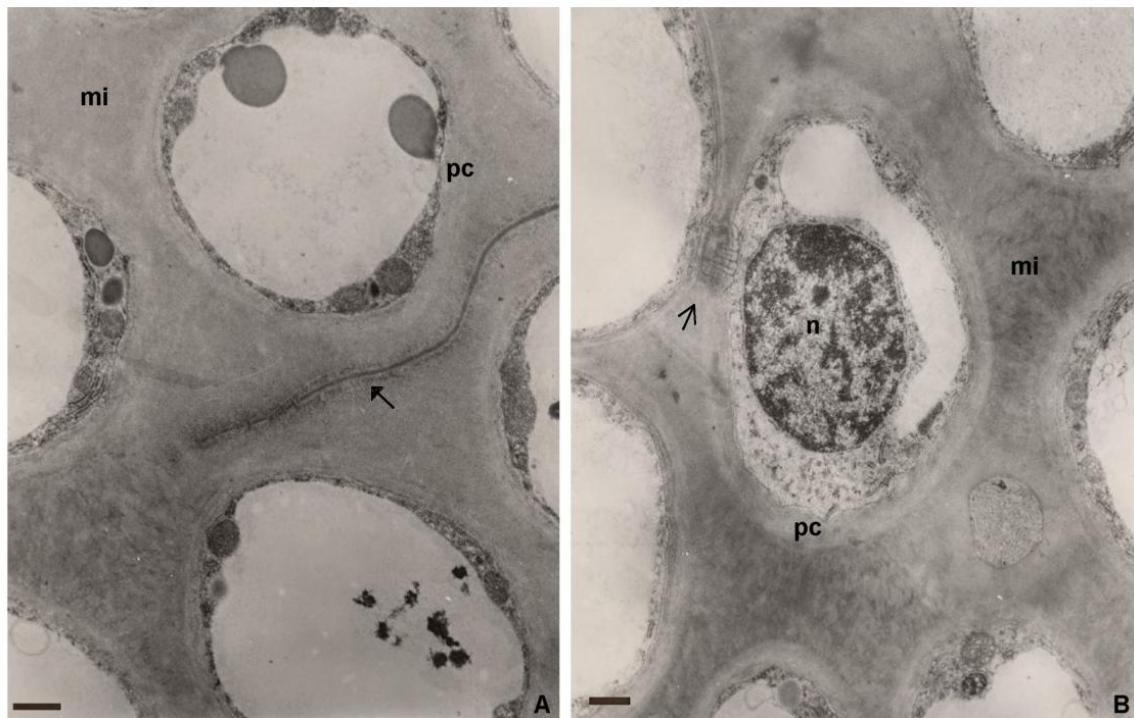


Figura 9. Fotos con MET. Post-antesis. **A)** Corte transversal del tejido de transmisión, zona de unión entre ambas ramas estilares (flecha), pared celular (pc) y matriz intercelular (mi) de mayor electrodensidad. **B)** Corte transversal del tejido de transmisión, pared celular (pc), matriz intercelular (mi), núcleo (n) y restos de plasmodesmos (flecha). *Barra:* 1 μ m.

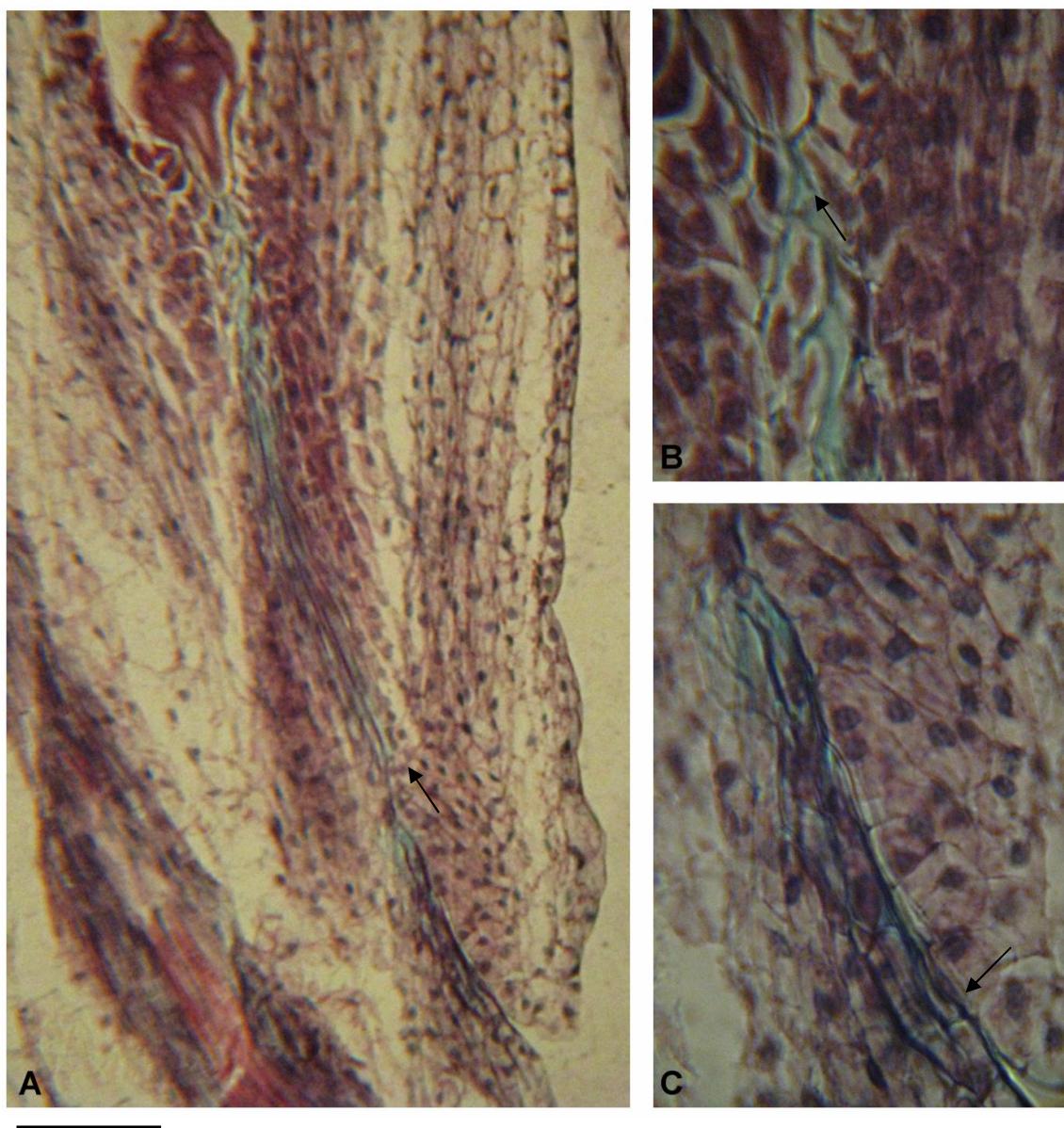


Figura 10. Tejido de transmisión del óvulo. Fotos con MO. **A)** Aspecto general del óvulo, tejido de transmisión del lado del funículo (flecha). **B)** Detalle del tejido tranmisor en el extremo micropilar del gametófito femenino (flecha). **C)** Detalle del tejido de tranmisión en el extremo micropilar del óvulo (flecha). *Barra: A: 30 µm; B, C: 60 µm.*

CAPITULO VI

Fertilización y endospermogénesis.



6.1. Introducción.

Cocucci (1981) divide el proceso de fertilización en cuatro etapas. La primera corresponde al traslado de los gametófitos masculinos hasta el estigma y es conocida como polinización. Posteriormente hay un acercamiento entre ambos gametófitos, generalmente producido por el crecimiento del tubo polínico hasta hacer contacto con el gametófito femenino, con el cual se efectúa el acoplamiento o segunda etapa. La tercera etapa es la copulación o descarga de las gametas masculinas y la cuarta corresponde al desplazamiento de estas últimas hacia la oosfera y la célula media para fusionarse y formar el cigoto y la célula endospermogenética respectivamente. Las descripciones de este capítulo se basan en estas etapas del proceso de fertilización descriptas por Cocucci (1981).

Se ha propuesto que el suspensor de los embriones de las Angiospermas sirve como un órgano nutricional al empujar al embrión hacia el endosperma, y actuar con capacidad haustorial (Treub, 1879; Lloyd, 1902; Maheswari, 1950; Steeves y Sussex, 1972; Clutter *et al.*, 1972; Walbot *et al.*, 1972). Newcomb (1973b) reportó los cambios que ocurren en el gametófito femenino de *Helianthus annuus* L. variedad *Pereodic* después de la fertilización y los correlacionó con las funciones aparentemente nutricionales de los tejidos del megagametófito y cercanos a él. Yan *et al.* (1990) estudiaron la ultraestructura del desarrollo de las células del gametófito femenino desde tres días antes de la antesis hasta un día después de la fertilización y discutieron la relación entre la oosfera, las sinérgidas y la célula media. Sin embargo, no hicieron

ninguna descripción de las antípodas.

Yan *et al.* (1991) observaron de uno a cuatro tubos polínicos en la micrópila. Ellos informan que durante el pasaje de los mismos a través de la micrópila, la mayoría de los tubos polínicos se restringe a la zona próxima al funículo. Mencionan que en el 81% de los casos la sinérgida que se degrada es la localizada hacia el lado del funículo. Por lo tanto habría una relación cercana entre la organización de la micrópila, la orientación del crecimiento del tubo polínico y la degradación de la sinérgida.

Estudios ultraestructurales y bioquímicos han revelado que el endosperma no sólo es esencial para el embrión antes de alcanzar la madurez sino que también es importante durante la germinación (Bhatnaga y Sawhney, 1981). El girasol, como es general en Asteraceae, acumula sus materiales de reserva principalmente en el embrión y particularmente en los cotiledones (Esau, 1965). El endosperma es de tipo nuclear (Esau, 1965; Bhatnagar y Sawhney, 1981) y los estadios tempranos de su diferenciación fueron descriptos por Newcomb (1973b). Psaras (1984) estudió la ultraestructura del endosperma maduro en relación con la germinación en la lechuga .

El objetivo de este capítulo fue estudiar la fertilización, el desarrollo del embrión y del endosperma en DK 4050. Adicionalmente se estudió, empleando microscopía electrónica de transmisión, el endosperma de semillas cuyos embriones presentaban cotiledones anormales, y/o pertenecientes a frutos abortados tempranamente.

6.2. Resultados.

6.2.1. Fertilización.

Cuando las flores se encontraban en el estadio de gametófito femenino maduro (Figs. 1A, 2B) se realizó la polinización manual, dando inicio así al proceso de fertilización. La segunda etapa de éste, el acoplamiento, comienza en el momento en que los microgametófitos germinan, lo cual se observó que ocurre veinte minutos después de haber entrado en contacto el polen con el estigma (Figs. 2A). Los tubos polínicos crecen a través de las células estigmáticas hacia el tejido de transmisión del estilo y continúan por este último hasta llegar a la micrópila del óvulo luego de transcurrida una hora de la polinización. Los tubos polínicos avanzan a través del tejido que limita el canal micropilar, el cual presenta las mismas características que el tejido transmisor (Fig. 2C). Se observó únicamente un tubo polínico por micrópila. La copulación, que involucra la descarga de las gametas, se visualizó veinte minutos después de la llegada del tubo polínico al saco embrionario (Figs. 1B, 2D).

El tubo polínico crece a través de una de las sinérgidas, donde libera ambas células espermáticas junto con el núcleo del tubo. Una gameta masculina se fusiona con la oosfera para formar el cigoto, y la otra hace lo propio con la célula media, para dar origen a la célula endospermogenética (Fig. 3A, B).

La sinérgida que recibe la descarga del tubo polínico comienza a degradarse rápidamente (Fig. 2D), aunque pueden observarse restos de la misma hasta el estadio de

embrión globular (Fig. 6A). La otra sinérgida persiste prácticamente intacta durante las primeras divisiones del proembrión, momento en el que su núcleo comienza a mostrar signos de degradación y finalmente en el estadio de embrión globular maduro solo se observan restos de la misma.

6.2.2. Desarrollo y ultraestructura del endosperma.

El núcleo endospermogenético resulta de la fusión de los dos núcleos polares con el del gameto masculino (Fig. 3A, B). En un comienzo se observa cercano al cigoto, y rápidamente se divide mitóticamente. El endosperma es de tipo nuclear, es decir que se producen numerosos núcleos por cariocinesis o división nuclear libre, sin que ocurran las respectivas citocinesis (Fig. 4A, B). Estas divisiones nucleares pueden o no ser simultáneas, pero con seguridad ocurren antes de las primeras divisiones del cigoto, ya que varios núcleos endospermáticos están presentes en el estadio de proembrión bicelular. Esto se debe a que el cigoto atraviesa por un período de reposo antes de comenzar a dividirse.

Los núcleos endospermáticos se disponen en el citoplasma periférico, con una gran vacuola central. En el estadio de proembrión globular ya se observa cierto grado de celularización en el extremo micropilar, mientras que en la zona central y calazal se mantienen los núcleos libres (Fig. 5A, B). Antes de que el embrión termine de desarrollarse, se observan como máximo cuatro capas de células endospermáticas.

Cuando el embrión ha alcanzado su madurez, una única capa de células endospermáticas está presente (Fig. 6B), por lo que las restantes han sido consumidas.

En los frutos cuyos embriones no desarrollaron cotiledones normales y/o abortaron, el endosperma también se encuentra formado por una única capa de células (Figs. 7A, B, 8A-D, 9A, B). Estas células se observan muy vacuolizadas, con su citoplasma restringido a la periferia, núcleo grande, numerosos glóbulos lipídicos y algo de retículo endoplasmático. No se han observado otras organelas. En estas células la pared crece considerablemente hacia el interior del lumen, encerrando restos de citoplasma hasta lograr su degradación total (Fig. 9A, B). El embrión no acumula sustancias de reserva y la mayoría de sus células se atrofian, con lo cual la mayor parte del grano queda vacío. Por lo tanto, la capa de endosperma se repliega sobre sí misma encerrando al delgado embrión en el extremo micropilar (Fig. 7A, B). En algunos sectores se puede observar parte del tegumento del óvulo que aborta muy próximo al endosperma (Fig. 8A-D).

6.2.3. Células del tapete tegumentario o endotelio.

En los híbridos comerciales P30, CF 17 y DK 4050, las células del endotelio se dividen anticlinal y perclinalmente durante la embriogénesis. En el extremo micropilar del saco embrionario se observan de una a dos capas de células mientras que en el extremo calazal este tejido puede estar formado por hasta seis capas de células. El

endotelio, que originalmente envuelve de las dos terceras partes a todo el gametófito femenino, crece rodeando las antípodas, a la altura de las paredes gruesas, encerrándolas y aislandolas entre sí y del endosperma y el embrión. No sólo aumenta el número de células que componen el tapete tegumentario sino también el tamaño de las mismas, las cuales se elongan de manera tal que sus ejes longitudinales quedan paralelos al megagametófito. Las antípodas persisten hasta estadios avanzados de la embriogénesis y comienzan a degenerar un poco antes que el endotelio o al mismo tiempo. En el estadio de embrión cordiforme maduro ya no se observan restos de tapete tegumentario ni de antípodas (Fig. 5A, B).

En la línea endocriada HA 89, las células del endotelio aumentan de tamaño, pero no se observa un incremento en su número. En este genotipo las antípodas también persisten, pero sólo separadas del embrión y del endosperma por las paredes rotundas que las rodean.

6.3. Discusión.

Este trabajo constituye la primera descripción detallada de la dinámica de los tubos polínicos del girasol desde la polinización hasta la llegada del tubo polínico a la micrópila del óvulo. De la misma manera, es la primera vez que se realiza el seguimiento completo de todo el camino que recorren los tubos polínicos para poder descargar las gametas en una de las sinérgidas.

Los granos de polen que entran en contacto con el estigma tardan aproximadamente veinte minutos en empezar a germinar, y alcanzan el micrópilo después de una hora de haberse realizado la polinización manual. Sin embargo, la descarga de las gametas y la singamia no ocurren hasta transcurridos otros veinte minutos más. Los núcleos espermáticos raramente se pueden visualizar en el megagametófito de Angiospermas porque el proceso de copulación ocurre en un corto período de tiempo (Maheswari, 1950). En girasol, Newcomb (1973b) observó a los núcleos espermáticos próximos al núcleo polar secundario y al núcleo de la oosfera, pero no pudo ver la descarga en la sinérgida. Atribuye esto a la densidad del citoplasma de la sinérgida en degradación. En este trabajo, al igual que en el realizado por Yan *et al.* (1991), se han podido observar dichos núcleos en la sinérgida luego de la descarga del tubo polínico.

Yan *et al.* (1991) describen de uno a cuatro tubos polínicos en la micrópila del óvulo. Por el otro lado, Newcomb (1973b) acepta que no logró reconocer el tubo polínico aunque infiere su presencia y hace alusión a la dificultad de observar el mismo en estos tejidos. En este trabajo se observó un único tubo polínico en la micrópila de cada óvulo, aunque al tejido transmisor del estilo pueden llegar varios.

Los tubos polínicos que alcanzan la micrópila del óvulo crecen por el lado proximal al funículo, específicamente a través del tejido transmisor de la micrópila, el cual se desarrolla sólo de ese lado. Es por esta razón que existe una mayor tendencia a que la descarga se realice en la sinérgida localizada hacia el funículo, del mismo lado del camino que siguen los tubos polínicos. Esto coincide con las observaciones

realizadas previamente por Yan *et al.* (1990, 1991).

Los eventos que ocurren durante y después de la fertilización ofrecen un ambiente nutricional diferente para la oosfera que, luego de la singamia se convierte en el cigoto. Se cree que las funciones de las sinérgidas durante la fertilización son: la primera, atraer y facilitar la penetración de los núcleos espermáticos al gametófito femenino, y la segunda, proveer de nutrientes al embrión en desarrollo (Newcomb, 1971). En girasol no se observan signos de degradación de ninguna de las sinérgidas antes de la fertilización. Luego de la llegada del tubo polínico la sinérgida receptora comienza a abortar rápidamente. Sin embargo, pueden observarse todavía restos de la misma en el estadio de embrión globular maduro. Según Newcomb (1973b), quien hizo una observación similar, es probable que los contenidos de las sinérgidas sean absorbidos, por lo menos en parte, por el embrión en formación.

La sinérgida que no recibe al tubo polínico persiste sin signos de degradación hasta las primeras divisiones del proembrión. Para Newcomb (1973b) parecería permanecer activa como lo sugieren la integridad de su pared, su creciente contenido lipídico y un incremento leve del contenido de almidón en sus plástidos. Por lo tanto, la sinérgida persistente podría estar involucrada en la traslocación de metabolitos hacia el embrión en desarrollo o incluso hacia el endosperma (Newcomb, 1973b). En *Ammobium alatum* la sinérgida persistente aumenta su tamaño hasta igualar al suspensor y su citoplasma pierde la vacuolización característica observándose altamente denso (Davis, 1962). En *Cotula australis* la sinérgida persistente aumenta su tamaño y forma un haustorio que estaría involucrado en la digestión del tapete tegumentario

(Davis, 1961). La sinérgida persistente de *Allium* juega un papel muy importante en la nutrición del embrión antes del desarrollo del endosperma (Maheshwari, 1948).

El núcleo endospermogenético se divide numerosas veces antes de las primeras divisiones del cigoto. La formación de paredes comienza en el extremo micropilar del citoplasma periférico del endosperma y se extiende hacia la calaza a medida que madura el embrión. Newcomb (1973b) sugiere que la formación de paredes es independiente de un aparato mitótico y que éstas crecen libremente, y se originan por la coalescencia de vesículas provenientes del aparato de Golgi, cercanas a las zonas de crecimiento de la misma. En este trabajo se observó que el núcleo endospermogenético se divide inmediatamente después de haberse formado, sin que esto sea seguido de formación de pared, por lo que da lugar a un endosperma de tipo nuclear, el cual comienza a celularizarse recién en el estadio de pro-embrión globular.

No se conocen claramente las ventajas de la compartimentalización del endosperma nuclear. Para Newcomb (1973b), la formación de paredes es una forma de almacenar carbohidratos en un estado insoluble que puede ser utilizado en etapas avanzadas. El endosperma es una fuente importante de metabolitos para el embrión en desarrollo (Brink y Cooper, 1947; Maheshwari, 1950; Raghavan, 1966; Raghavan y Torrey, 1963). Sin embargo, algunos investigadores han cuestionado la función del endosperma en estadios tempranos de la embriogénesis. Schulz y Jensen (1969) consideran que en *Capsella* el endosperma, que está aún desarrollándose en el estadio de embrión cordiforme, no contribuye significativamente a la nutrición del embrión. En el girasol, el desarrollo del endosperma comienza antes que las primeras divisiones del

embrión. Sin embargo, no está totalmente formado hasta el estadio de embrión globular maduro, por lo que su función nutricional podría ser limitada en las primeras etapas de la embriogénesis. Newcomb (1973b) considera que en estos primeros estadios, es la sinérgida persistente la que aporta la mayor cantidad de metabolitos que permiten el crecimiento del pro-embrión. Las observaciones realizadas en este trabajo respaldan esta idea.

Yan *et al.* (1991) describen la ultraestructura del endosperma de embriones jóvenes. Los plástidos presentan un estroma muy denso y se concentran alrededor del núcleo endospermogenético primario o de los núcleos hijos. Durante la embriogénesis, la cantidad de estos plástidos va disminuyendo hasta los niveles previos a la fertilización, las mitocondrias se localizan cercanas a las proyecciones de la pared en el extremo micropilar del saco embrionario y hay un aumento marcado en la cantidad de cuerpos lipídicos que se concentran en el extremo calazal de la cigota y del embrión bicelular. A medida que avanza la embriogénesis, el número de cuerpos lipídicos disminuye.

En este trabajo se estudió la ultraestructura del endosperma maduro en aquellos granos que no forman embriones con cotiledones bien desarrollados, dado que no existían descripciones previas. En estos granos sólo permanece una capa de células de endosperma cuando el embrión ya está totalmente formado. La característica más notable de las mismas es la persistencia de una gran cantidad de cuerpos lipídicos, así como el crecimiento de la pared celular por la deposición de capas concéntricas hacia el citoplasma, encerrando entre ellas parte del mismo.

Según Newcomb (1973b), en girasol no siempre hay una doble fertilización y triple fusión. Este autor observó embriones que crecían normalmente en ausencia de endosperma, únicamente rodeados por el citoplasma de la célula media con el núcleo endospermogenético o incluso en ausencia del mismo. Esto no se encontró en ninguno de los genotipos aquí estudiados. Una posible explicación para las observaciones de Newcomb es que las condiciones ambientales en que crecieron las plantas muestreadas por él no fueron las óptimas y por lo tanto se desarrollaron algunos megagametófitos anómalos.

Newcomb (1973b) observó un aumento en el tamaño de las células del endotelio luego de la fertilización, tal como lo observado en los híbridos aquí estudiados, junto con un incremento en el número de capas celulares. Si embargo, esto no ocurre en la línea endocriada, HA 89, cuyo endotelio no sufre mayores modificaciones una vez ocurrida la fecundación. El crecimiento de este tejido puede deberse al pasaje de sustancias nutritivas desde las antípodas, que luego serían utilizadas por el embrión joven y el endosperma en formación.

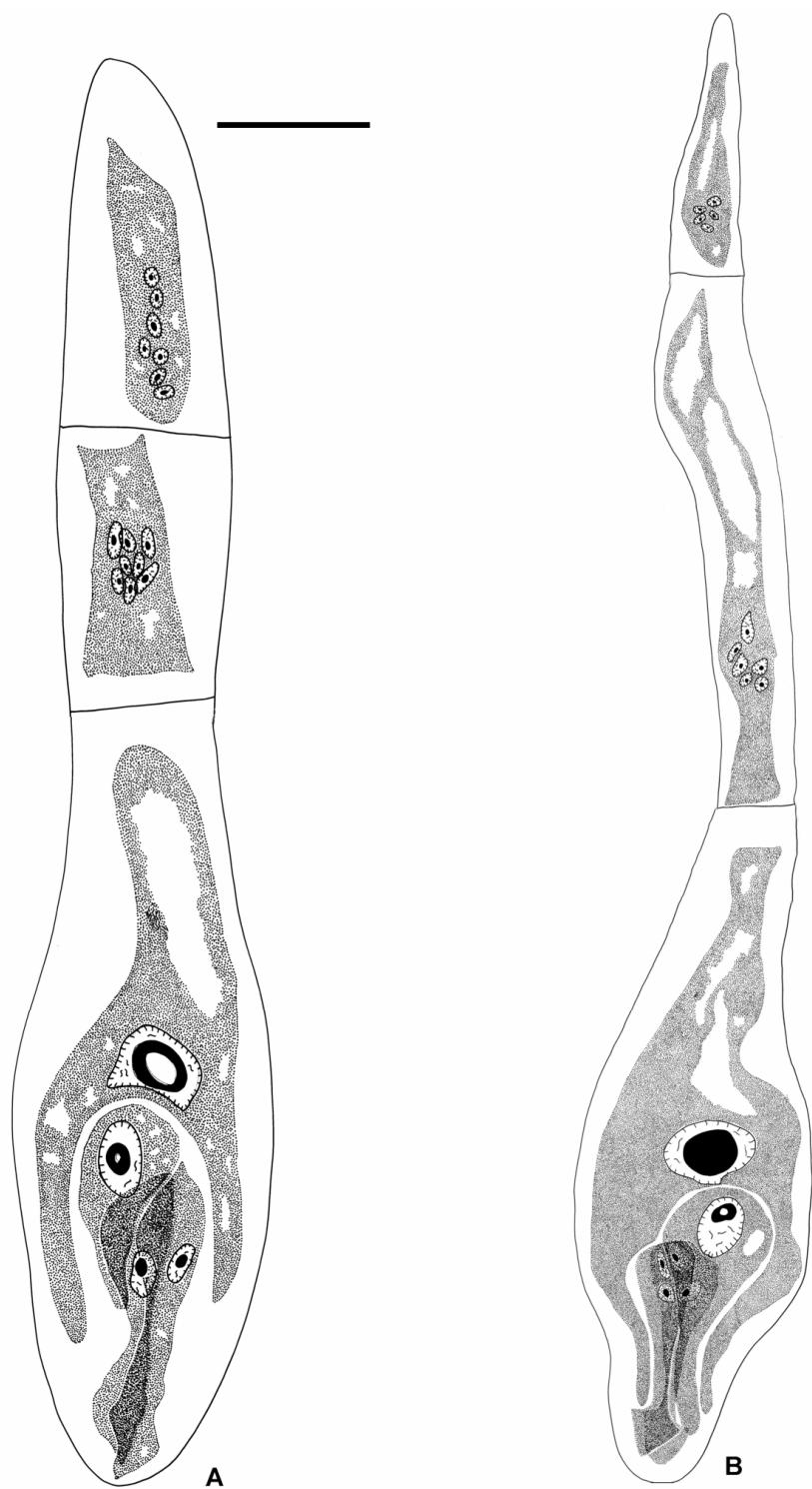


Figura 1. A) Gametófito femenino maduro, previo a la fertilización. B) Megagametófito recién fecundado, sinérgida descargada donde se observan las gametas masculinas. *Barra: 50 µm.*

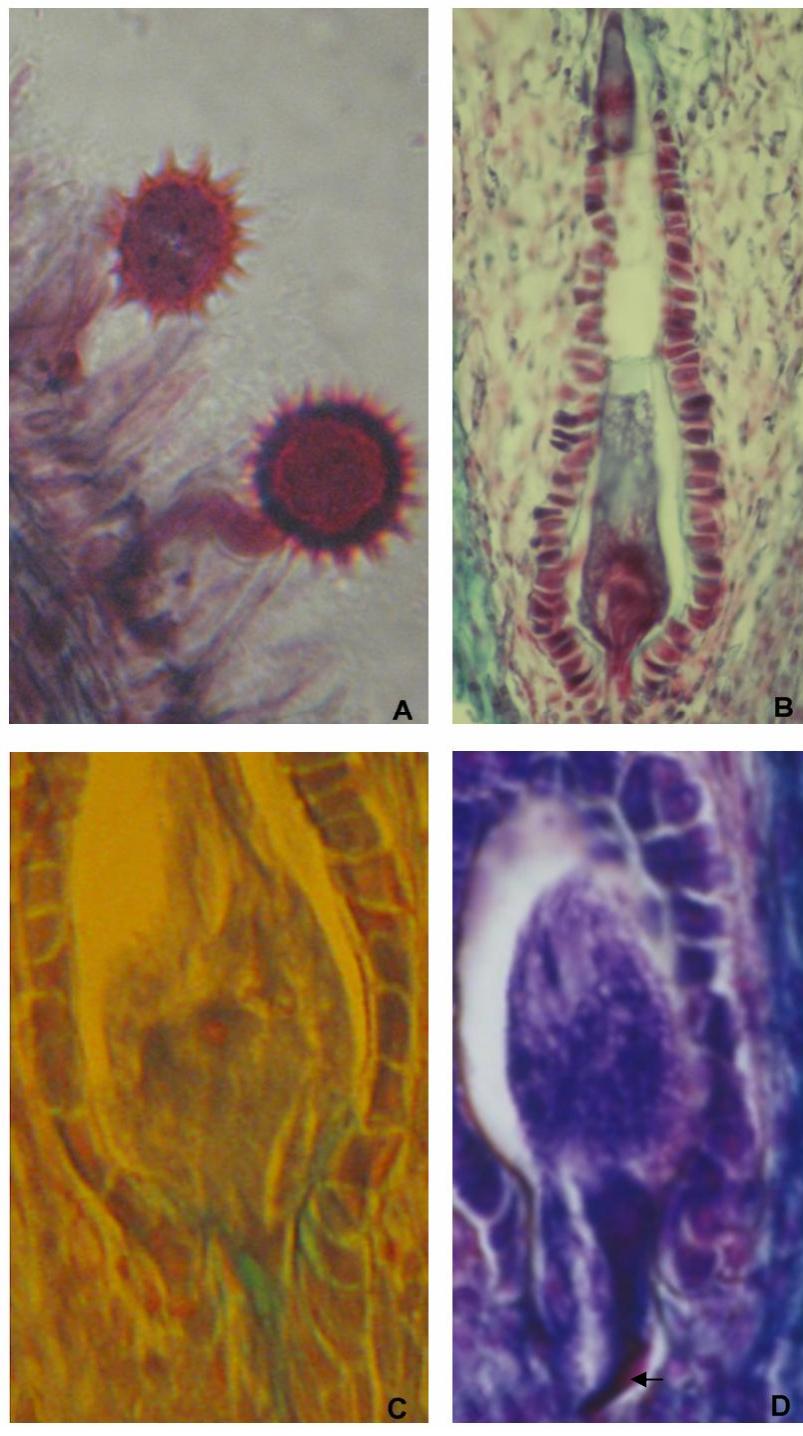


Figura 2. A) Granos de polen germinando en el estigma. B) Gametófito femenino maduro, previo a la fertilización. C) Extremo micropilar del gametófito femenino al momento de la fertilización D) Detalle de la sinérgida que recibió la descarga del tubo polínico (flecha). *Barra: A, D: 22 µm, B: 50 µm, C: 18 µm.*

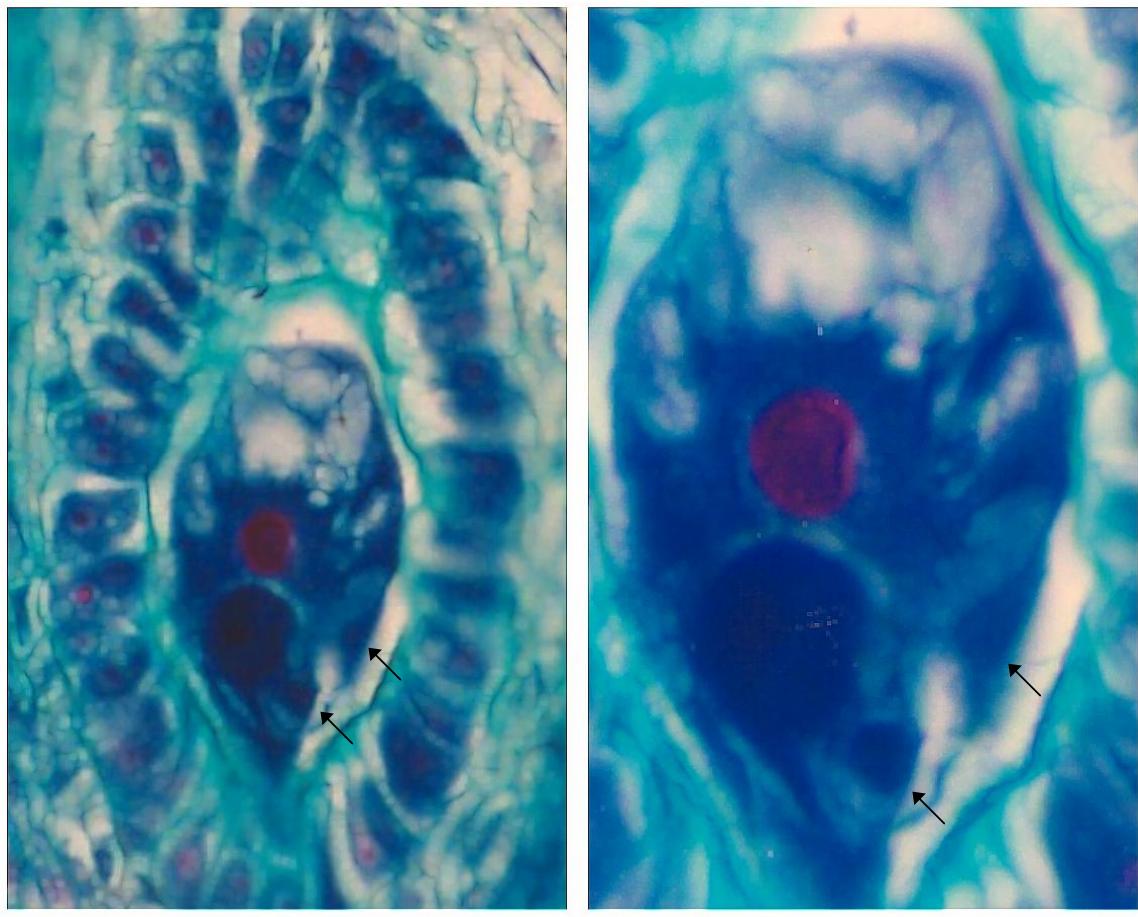


Figura 3. Fertilización en DK 4050. **A:** Gameta masculina fusionándose con la oosfera para formar el cigoto, y gameta masculina fusionándose con la célula media (flechas). **B:** Detalle de las gametas (flechas). *Barra:* **A:** 20 μ m, **B:** 10 μ m.

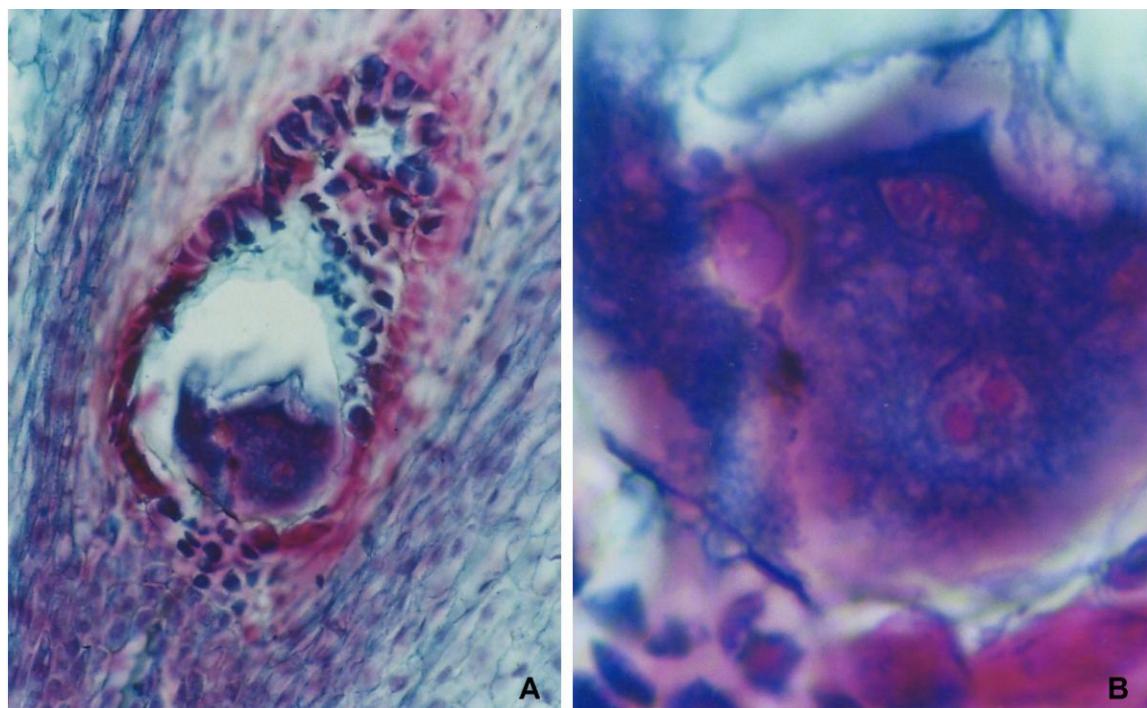


Figura 4. **A)** Primeras divisiones del núcleo endospermogenético. **B)** Detalle de los núcleos endospermáticos en división. *Barra: A: 53 µm, B: 14 µm.*

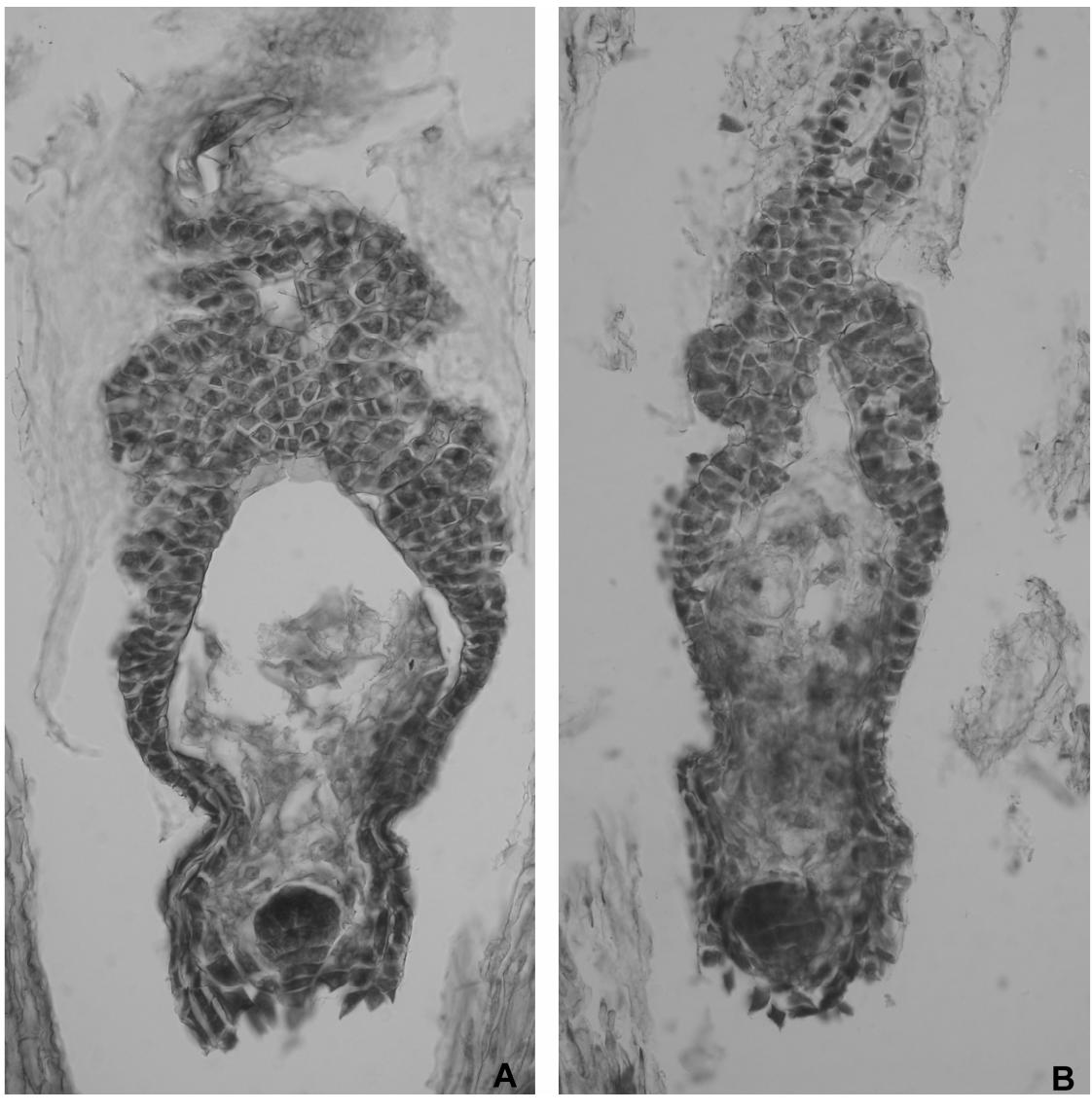


Figura 5. A y B) Aspecto de embrión globular con suspensor largo, endosperma nuclear y endotelio rodeando las antípodas. **B)** Endotelio rodeando la última antípoda. *Barra: 50 µm*

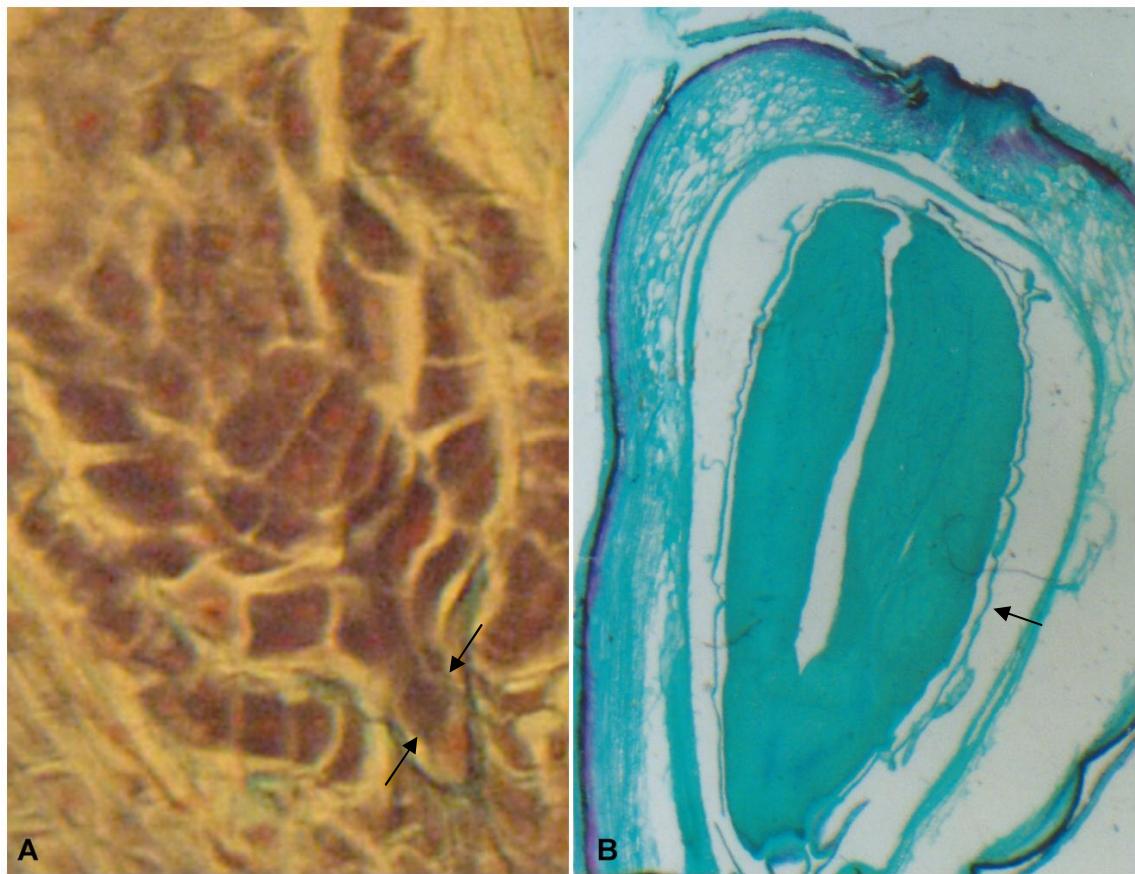


Figura 6. A) Sinérgidas presentes (flechas) en el estadio de embrión globular. B) Una única capa celular de endosperma (flecha) en el estadio de embrión maduro. *Barra: 50 µm*

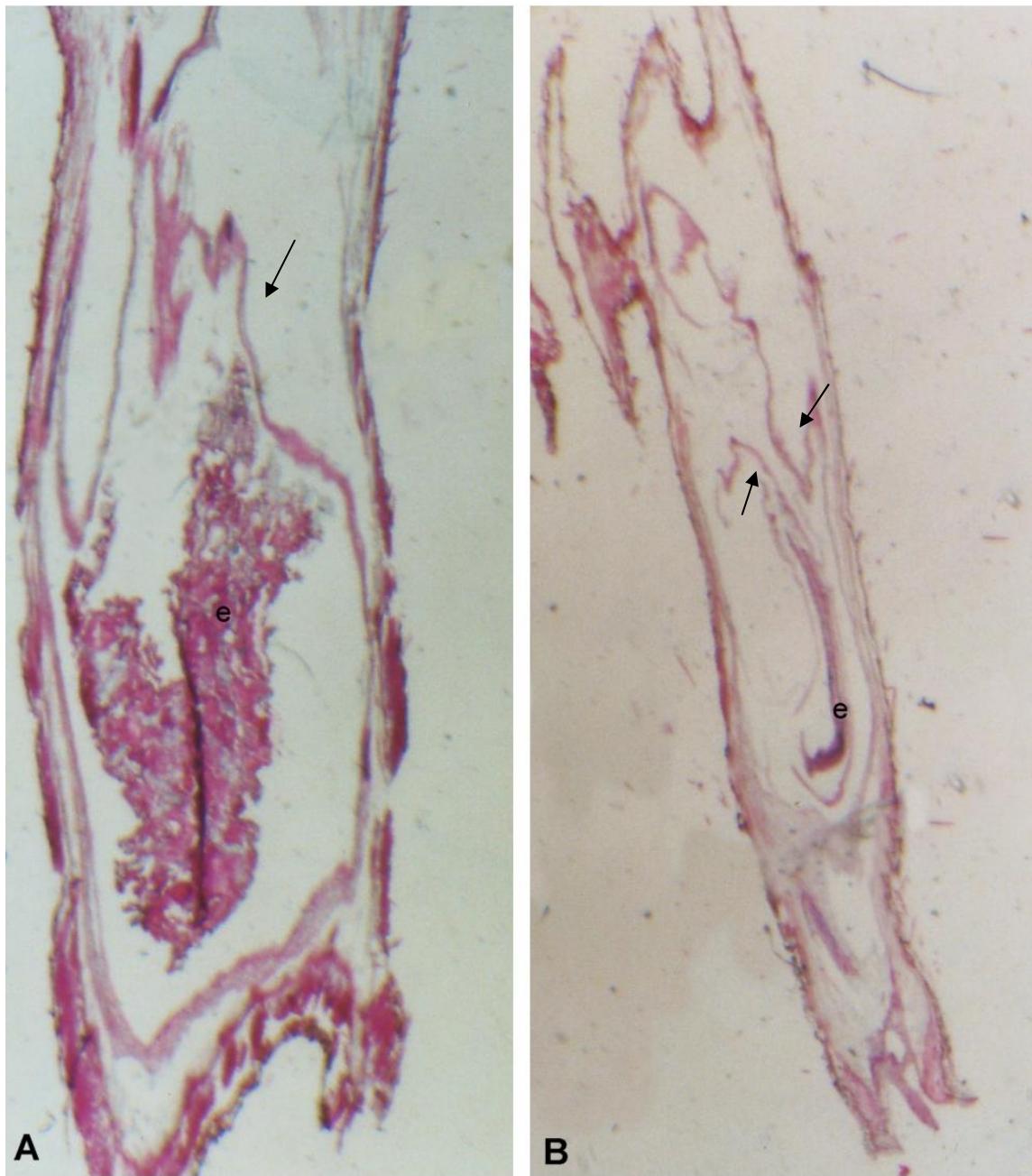


Figura 7. **A)** Embrión abortado (e), y endosperma (flecha) rodeándolo. **B)** Embrión con sus cotiledones poco desarrollados; el endosperma (flechas) crece dejando al embrión (e) en el extremo micropilar.

Barra: **A:** 30 μ m, **B:** 50 μ m.

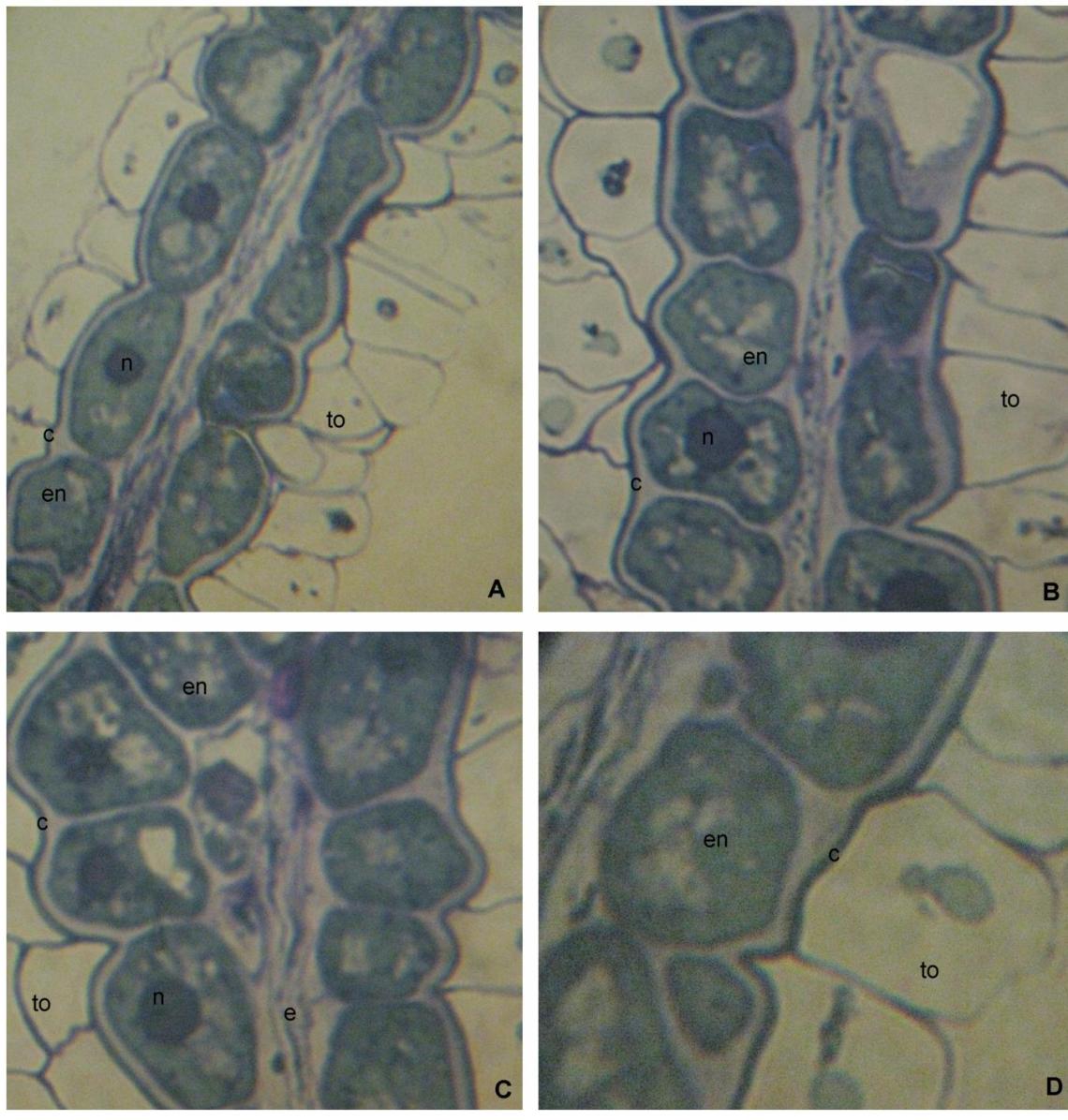


Figura 8. Endosperma de un embrión con los cotiledones poco desarrollados. Fotos con MO. **A)** Aspecto general. **B)** Células del tegumento del óvulo (to) adheridas al endosperma (en). **C)** Zona donde se evidencia que es una única capa de células de endosperma que rodea y sobrepasa al embrión (e). **D)** Detalle de células del endosperma con una cutícula gruesa (c). *Barra: A: 14 µm; B, C: 8 µm; D: 0,5 µm.*

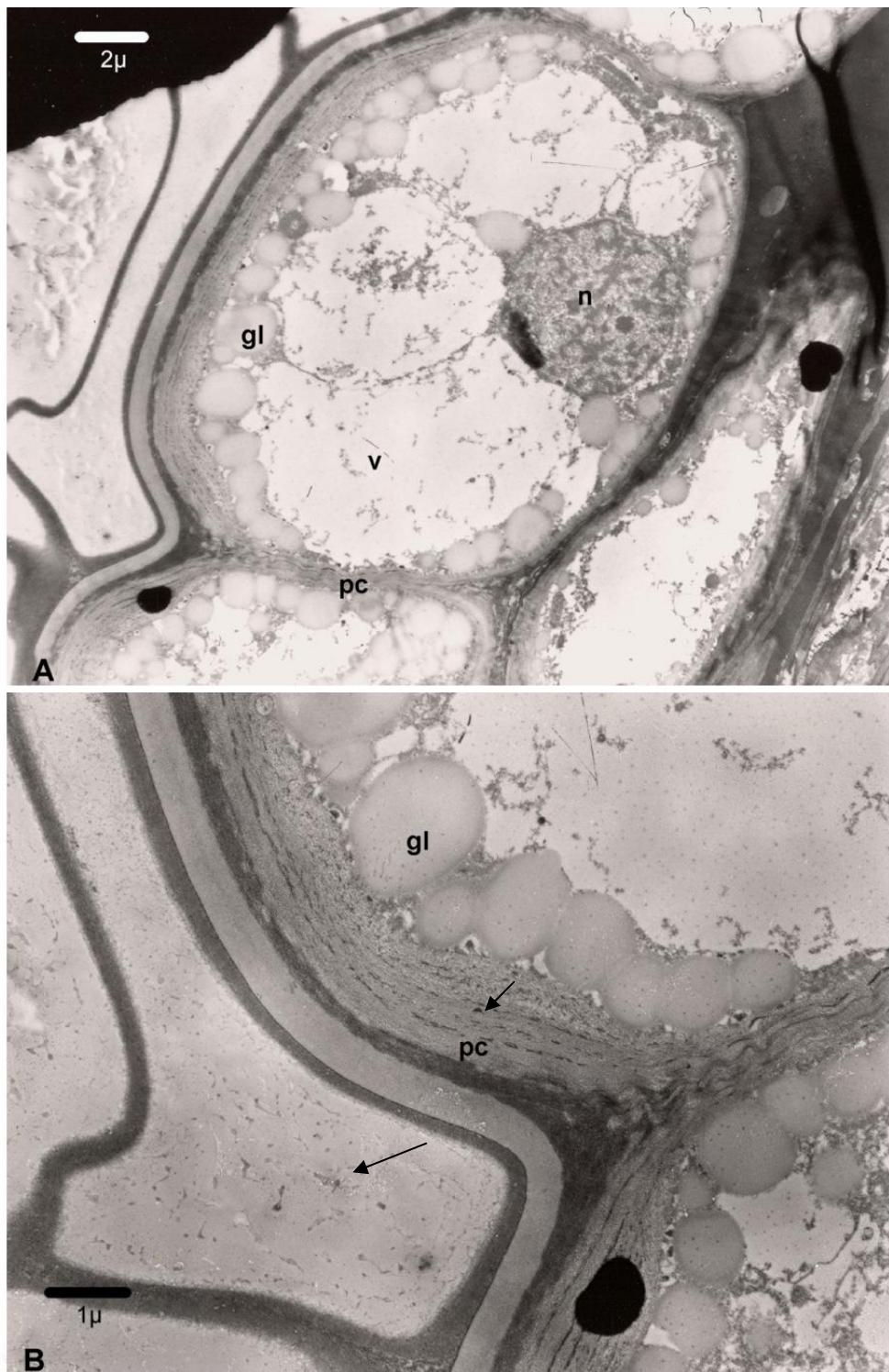


Figura 9. Endosperma de embrión con cotiledones poco desarrollados. Fotos con MET. **A)** Aspecto general de células del endosperma con una cutícula gruesa (flecha), pared celular (pc), vacuolas (v), glóbulos lipídicos (gl) y núcleo (n). **B)** Detalle de las células del endosperma y de las células del tegumento del óvulo abortadas (flecha). La pared celular (pc) de las células del endosperma crecen encerrando al citoplasma (flecha) y desplazando los glóbulos lipídicos (gl) hacia el centro. *Barra: A: 2 μm, B: 1 μm*

CAPITULO VII

Embriogénesis y desarrollo del pericarpo



7.1. Introducción.

La ultraestructura de algunos estadios del desarrollo del embrión en girasol ha sido estudiada por Newcomb (1973b) y Yan *et al.* (1991). Sin embargo, ninguno de dichos autores describe en detalle todos los estadios de la embriogénesis. Además, uno de los objetivos perseguidos en este capítulo fue generar una barra temporal del desarrollo del embrión, desde el momento de la singamia hasta el estadio de embrión maduro, ya que esta información no existía para el girasol.

No se han encontrado trabajos publicados que informen si la identidad parental influye en la embriogénesis del girasol, y en particular, si el desarrollo embrionario tras cruzamientos entre híbridos comerciales difiere del que tiene lugar luego de una polinización intra-híbrido. Tampoco se conoce si el nivel de polinización (medido en número de granos de polen depositados en el estigma) influye en el desarrollo embrionario, aunque más no sea temporalmente. Por lo tanto, otro de los objetivos propuestos en este trabajo fue el de investigar el desarrollo embrionario bajo diferentes modalidades de polinización.

Lindström *et al.* (2007) realizaron un estudio histológico del desarrollo del pericarpo del fruto de girasol y analizaron las modificaciones producidas por sombreado antes y después de la antesis. En este capítulo se comparó la ontogenia del pericarpo de frutos normales con la de aquéllos cuyos embriones no desarrollan cotiledones normales.

7.2. Resultados

7.2.1. Embriogénesis

Una vez producida la descarga del tubo polínico (Figs. 1A, 3A), una de las gametas se fusiona con la oosfera para formar el cigoto. La primera división del cigoto es transversal y da origen a una célula apical pequeña y una basal de mayor tamaño (Figs. 1B, 3B, 4A). En este estadio, el endosperma ya presenta varios núcleos (Fig. 3C). La célula apical se divide verticalmente (Fig. 1C) y las dos células resultantes se vuelven a dividir en el mismo sentido. La célula basal se divide transversalmente, y la más basal de ellas continúa dividiéndose. Cuando el pro-embrión llega al estadio globular, presenta un suspensor multicelular de gran longitud (Fig. 2A, B).

El pro-embrión bicelular se distingue después de 15 horas de haber realizado una polinización manual. Las siguientes divisiones del mismo se observan transcurridas unas 16 horas de la llegada del polen al estigma, ya sea en baja o alta cantidad, del mismo o de distinto híbrido. A las 17 horas, el pro-embrión se observa en estadio globular y permanece en este estado hasta transcurridas las 48 horas, cuando comienza a visualizarse el esbozo de los futuros cotiledones. Pasadas unas 54 horas ya se distingue un embrión cordiforme, que se mantiene en este estadio hasta unas 72 horas de la polinización o más, cuando pasa al estadio de embrión torpedo (Figs. 4A-D, 14).

7.2.2. Cruzamiento entre híbridos

Todos los embriones de girasol observados hasta el momento presentan dos cotiledones. No se encontraron mayores diferencias entre los embriones de frutos obtenidos de los tratamientos de exclusión de polinizadores, polinización cruzada entre individuos de un mismo híbrido, entre individuos de distintos híbridos, y testigos de polinización libre (véase materiales y métodos). Bajo todos estos tratamientos experimentales se observaron tanto embriones normales (Fig. 5A) como embriones abortados (Fig. 5D), y frutos vacíos o con restos de gametófitos femeninos abortando presumiblemente por falta de polinización, sin que se detectaran diferencias entre genotipos. En cambio, bajo el tratamiento de autopolinización se observaron diferencias entre genotipos: mientras que los embriones de CF 17, DK 4050 y HA 89 no presentan diferencias con respecto a lo observado en otros tratamientos, los del híbrido P 30 exhibieron algunos casos de, cotiledones poco (Fig. 5B, C) a muy poco desarrollados (Fig. 5E, F), por lo que estos embriones resultaron mucho más delgados que los normales. Esto se debe a que sus células presentan un volumen menor que la de los embriones normales y el número de capas celulares que conforman los cotiledones también se encuentra disminuido.

7.2.3. Ultraestructura del embrión

Las células de la epidermis de los embriones normales presentan un citoplasma más denso (Fig. 6A) que las subepidérmicas (Fig. 6B) y sus núcleos ocupan la misma posición central (Fig. 6C, D). Las células subepidérmicas se caracterizan por tener paredes celulares relativamente gruesas, núcleos conspicuos, un gran número de glóbulos lipídicos, mitocondrias y dictiosomas (Fig. 7A-C).

Los embriones que no desarrollan normalmente sus cotiledones presentan células en distinto grado de degradación. Las células epidérmicas poseen un citoplasma denso y pueden presentar dos núcleos, mientras que las que forman el parénquima subepidérmico se encuentran sumamente vacuolizadas y poseen un solo núcleo (Fig. 8A-F). La degradación del citoplasma es tal que no se llegan a observar organelas (Fig. 9A-B).

7.2.4. Ontogenia del pericarpo.

El óvulo ocupa más del 50 % de la cavidad ovárica y se encuentra separado de la pared del carpelo desde antes de lograr su curvatura total (Fig. 10A, B). Esta característica se mantiene desde el estadio de célula madre de las megásporas hasta el de gametófito femenino maduro (Fig. 10 C, F).

El carpelo posee una epidermis externa con una cutícula gruesa y pelos formados por dos a tres células. Por debajo de este estrato se distingue una hipodermis formada por una única capa de células. El estrato medio está formado por aproximadamente 20 capas de células alargadas anticlinalmente y el estrato más interno está representado por un reducido parénquima conformado por células isodiamétricas que dejan entre sí pequeños espacios intercelulares (Fig. 11A). Por último, la epidermis interna del carpelo se observa poco diferenciada.

En el estadio de embrión globular, la hipodermis se divide en sentido pericinal y se amplía a unas cinco capas de células (Fig. 11B). En los estadios de embrión cordiforme y torpedo, las capas más externas del estrato medio comienzan a esclerificarse (Fig. 11C, D). A partir del estadio de embrión torpedo, entre este tejido esclerenquimático y la hipodermis se observa una capa oscura de fitomelanina, un material amorfo (Figs. 11D, 12A, B). En el estadio de embrión maduro las capas más externas del estrato medio se encuentran totalmente esclerificadas. En algunos sectores puede observarse el tegumento del óvulo en contacto directo con la epidermis interna del pericarpo (Fig. 12A-D).

El pericarpo de los embriones que no desarrollan normalmente sus cotiledones se encuentra sumamente reducido. La epidermis presenta menor cantidad de pelos, la hipodermis no se multiplica y el estrato medio está formado por un máximo de diez capas celulares, de las cuales sólo la más externa se esclerifica. El estrato de parénquima interno está muy reducido, y en algunos sectores la epidermis interna está en contacto con el tegumento del óvulo (Fig. 13 A-B).

7.3. Discusión.

A pesar de existir estudios ultraestructurales de algunos estadios del desarrollo del megagametófito después de la fertilización (Newcomb, 1973b; Yan *et al.*, 1991), ésta es la primer descripción detallada de la embriogénesis del girasol y de su progreso en el tiempo.

La primera división del embrión es transversal y tanto la célula basal como la terminal contribuyen en la formación del embrión. Por lo tanto el desarrollo del embrión se ajusta al tipo Asteráceo (Johansen, 1950; Davis, 1966). Esto concuerda con las observaciones de Newcomb (1973b) y Yan *et al.* (1991).

Los eventos que se suceden desde la polinización hasta la formación del embrión en estado torpedo se encuentran representados temporalmente en el esquema de la figura 14.

Las características ultraestructurales de los primeros estadios de la embriogénesis han sido descriptas por Newcomb (1973b) y por Yan *et al.* (1991). Dichos autores coinciden en gran parte de sus observaciones: las células del embrión contienen gran cantidad de ribosomas, que pueden estar arreglados en polisomas, tienen pocas vacuolas pequeñas y aparatos de Golgi, poseen muchas mitocondrias y los plástidos son pequeños, electrodensos e indiferenciados. A medida que el desarrollo del embrión avanza, los plástidos aumentan su tamaño y disminuyen su electrodensidad. En el estadio de embrión cordiforme comienzan a diferenciarse y poseen estructuras

semejantes a los tilacoides.

La uniformidad de los resultados obtenidos al analizar la embriogénesis tras diversas condiciones de polinización era esperable, ya que al tratarse de genotipos comerciales, cuyas diferencias fenotípicas son relativamente pequeñas, procesos básicos como los embriológicos no deberían exhibir mayor diversidad. Sin embargo, bajo autopolinización (es decir, polen del mismo individuo o de otros individuos del mismo genotipo) en el híbrido P 30 se encontraron embriones con los cotiledones poco a muy poco desarrollados. Este es el primer reporte de tales embriones en girasol. Se estudió la ontogenia temprana de dichos embriones sin encontrarse diferencias con aquellos que desarrollan correctamente sus cotiledones. Sin embargo, los embriones maduros se diferencian en el número de capas celulares y en el volumen de sus células, por lo tanto, se presume que a partir del estadio de embrión torpedo, las células disminuyen su crecimiento en tamaño y su ritmo de división en espesor, formándose así embriones con cotiledones de la misma longitud que los normales pero con tan sólo dos capas de espesor.

La ultraestructura de los embriones maduros normales difiere considerablemente de aquella que presentan los embriones cuyos cotiledones no se encuentran bien desarrollados. Las células de los primeros presentan gran cantidad de glóbulos lipídicos, mitocondrias y dictiosomas mientras que las de los últimos se encuentran sumamente degradadas, muy vacuolizadas y poseen hasta dos núcleos. A partir de esto, se puede inferir que los embriones que no desarrollan normalmente sus cotiledones abortan.

Lindström *et al.* (2007) estudiaron el desarrollo del pericarpo en girasol bajo condiciones normales y de sombreado. La descripción de la ontogenia del mismo bajo condiciones normales concuerda con la observada en este trabajo para los embriones que desarrollan sus cotiledones normalmente.

Estos autores encontraron que el número de capas celulares del pericarpo disminuye con el sombreado como consecuencia de una disminución en el número de divisiones celulares. Los embriones que no desarrollan normalmente sus cotiledones, pertenecientes al híbrido comercial P 30, también presentan pericarpos reducidos, con un número mucho menor de capas celulares. Asimismo, presentan un número considerablemente menor de pelos en la epidermis externa, en comparación con los pericarpos que envuelven a embriones bien desarrollados del mismo genotipo. En estos casos, tanto los embriones como el endosperma, el tegumento del óvulo y las distintas capas del pericarpo presentan claros signos de degradación.

Se comprobó que con ausencia de polinización el gametófito femenino aborta y se forma un fruto partenocárpico. Por lo tanto, estos frutos se encuentran totalmente vacíos o con un óvulo y un gametófito femenino abortados.

b _____
c _____

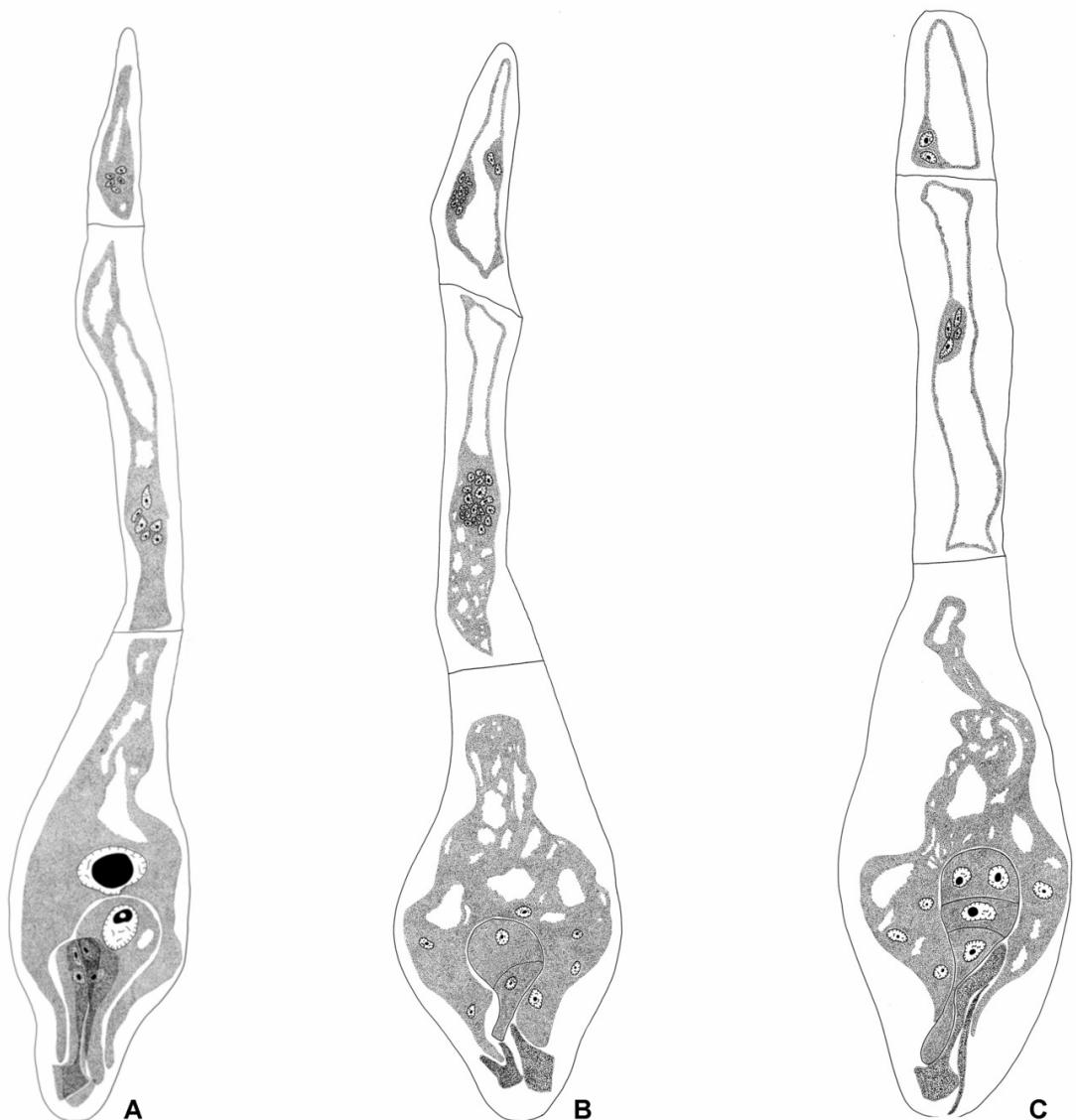


Figura 1. A) Saco embrionario recién fecundado. B) División transversal de la cigota. C) División vertical de la célula apical. *Barras:* 50 μm ; A: barra **b**; B, C: barra a.

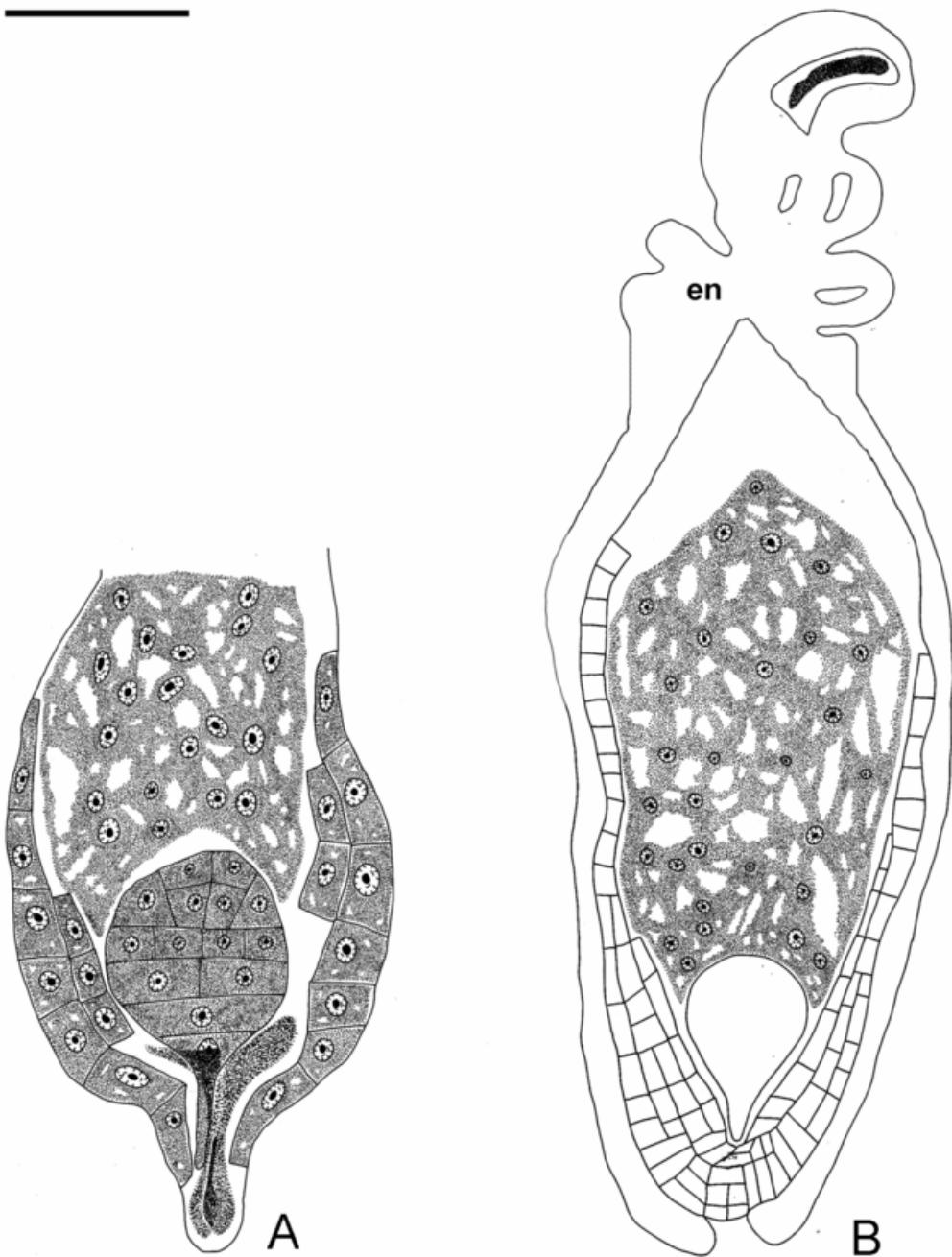


Figura 2. **A)** Embrión globular, suspensor largo, endosperma comienza a celularizarse en el extremo micropilar. **B)** Embrión globular más avanzado, mayor número de capas celulares de endosperma. *Barra: 50 µm*

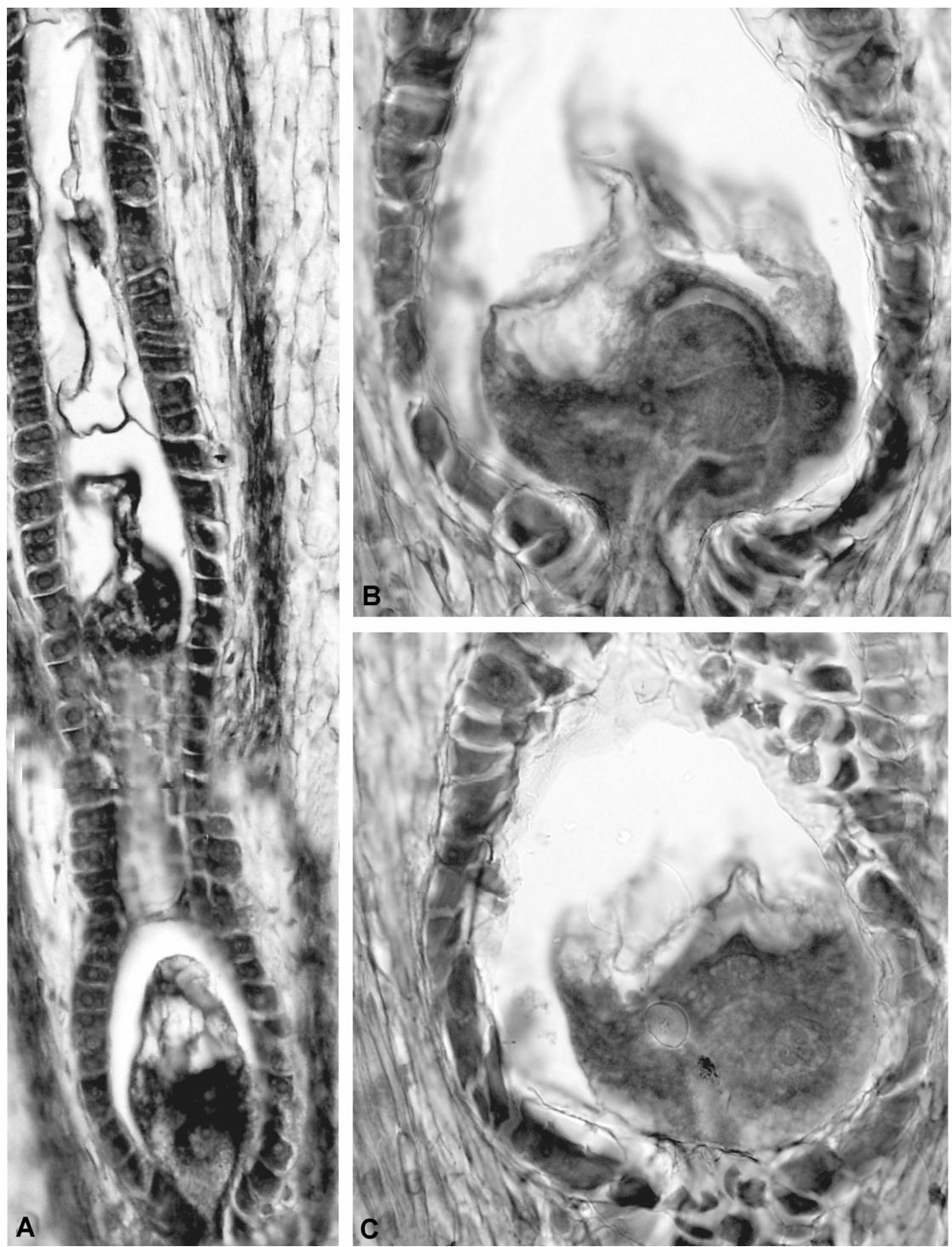


Figura 3. Gametófito fecundado, DK 4050. **A)** Gametófito femenino fecundado con dos antípodas. **B)** Cigoto bicelular. **C)** Endosperma nuclear. *Barra: A = 22,5 μ m; B, C = 30 μ m.*

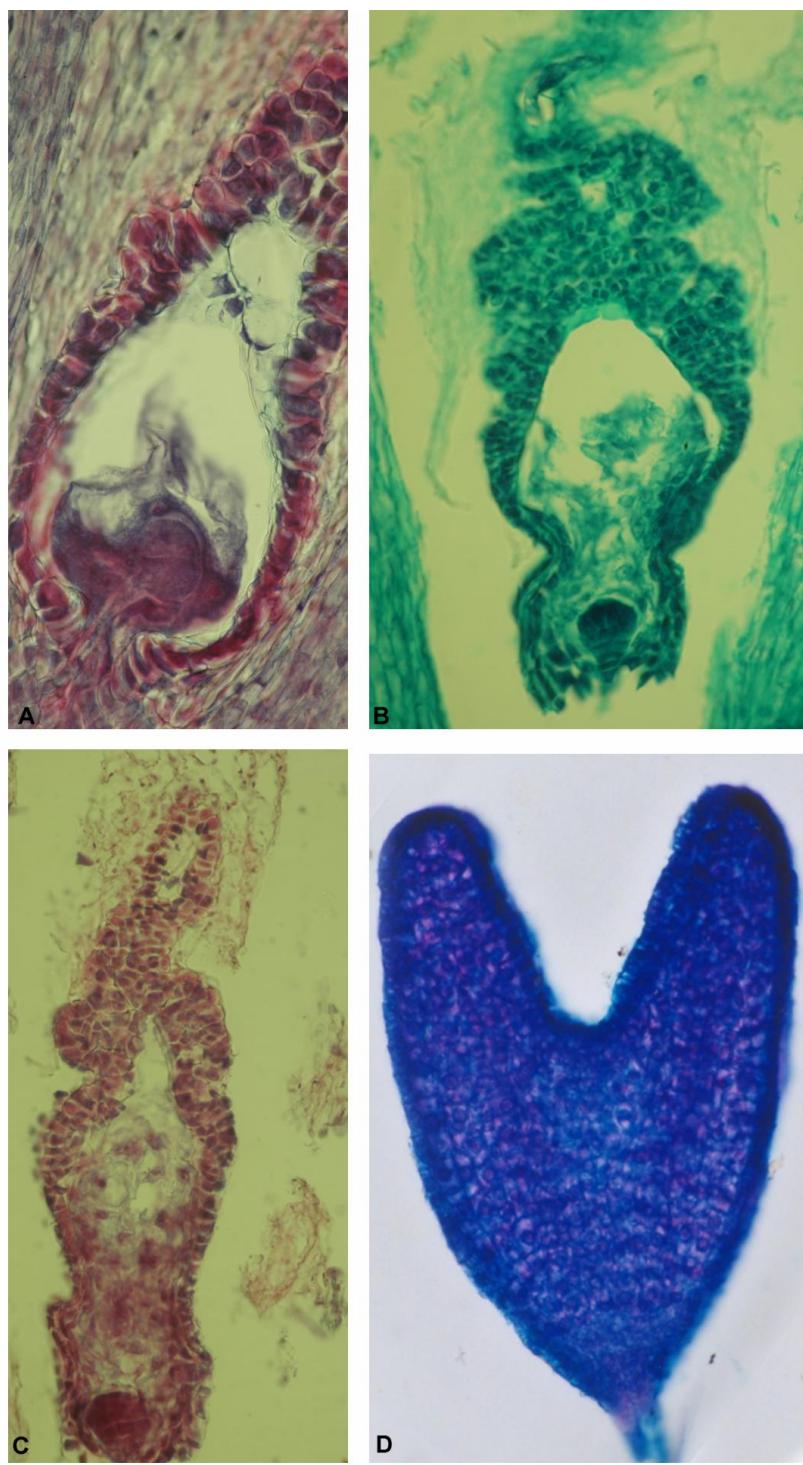


Figura 4. Fotos con MO. **A)** Primera división de la cigota. **B)** Embrión globular. **C)** Aspecto general del megagametófito en estadio de embrión globular, endosperma nuclear. **D)** Embrión cordiforme. *Barra: A, D: 50 µm; E: 100 µm; C: 60 µm.*

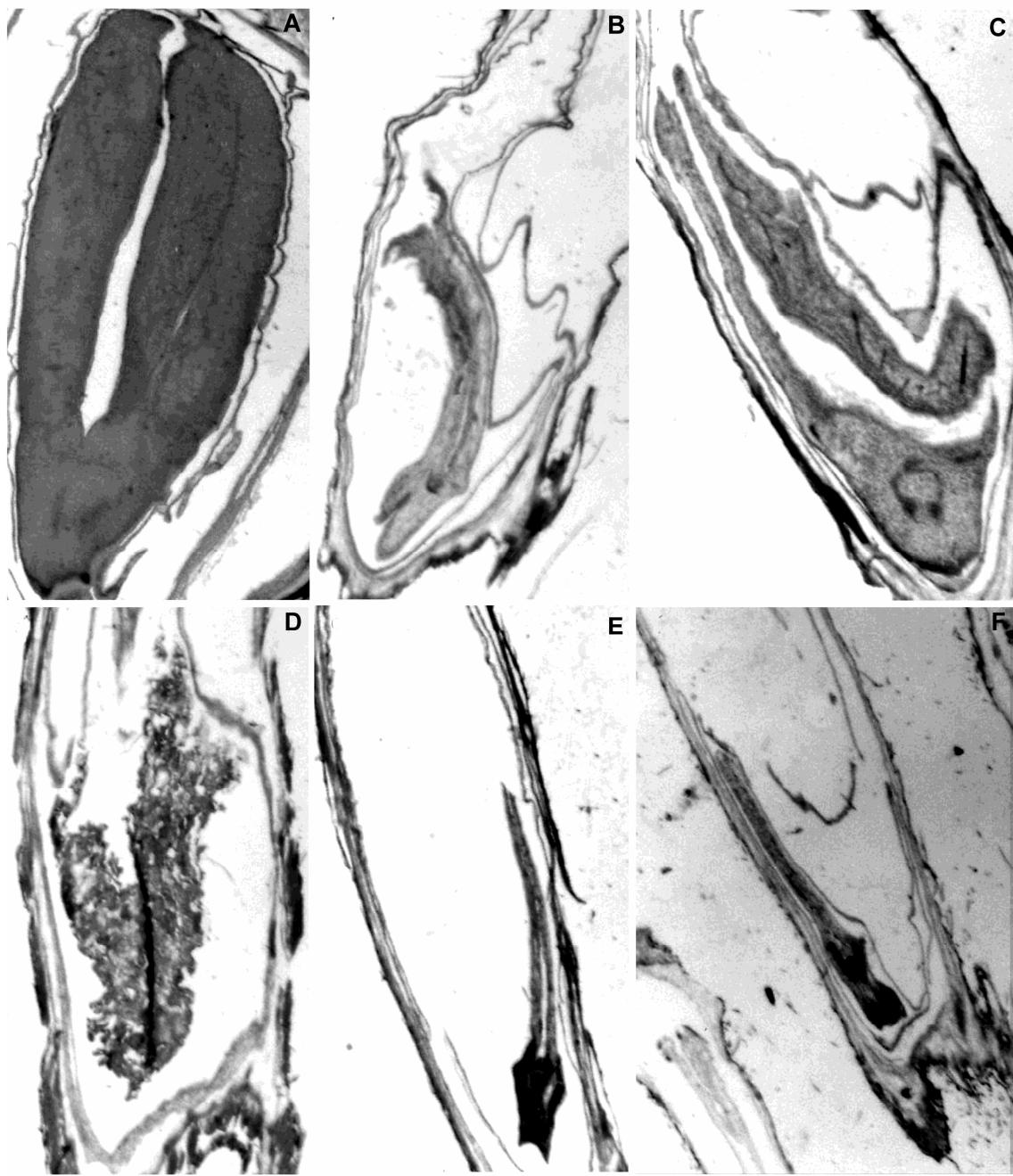


Figura 5. Fotos con MO. **A)** Embrión maduro normal. **B y C)** Embrión con sus cotiledones poco desarrollados. **C)** Detalle. **D)** Embrión abortivo con sus cotiledones desarrollados. **E y F)** Embrión maduro con sus cotiledones muy poco desarrollados. *Barra:* **A:** 50 μm ; **B:** 85 μm ; **C:** 62 μm ; **D-F:** 45 μm .

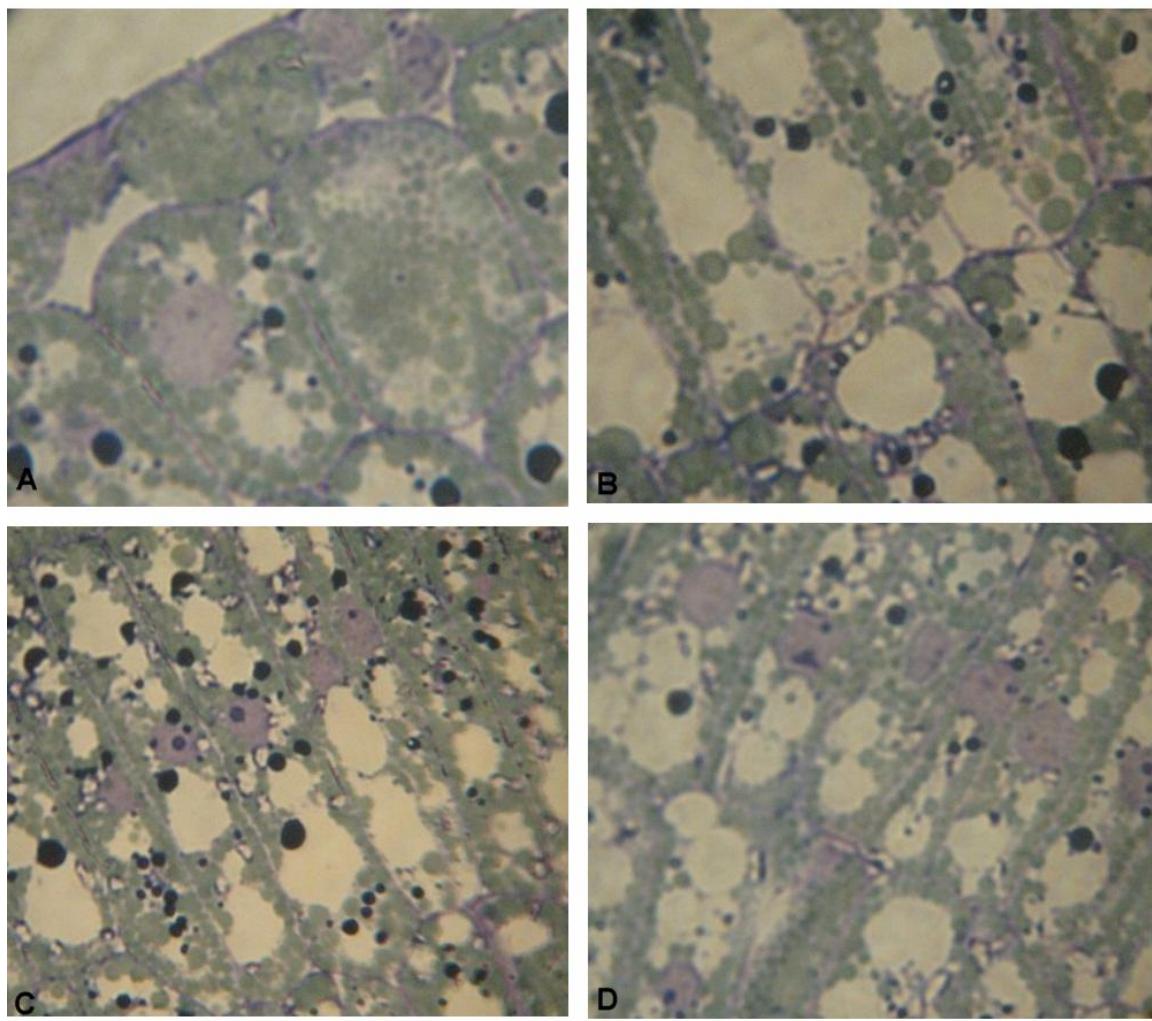


Figura 6. Fotos con MO de un embrión normal. **A)** Epidermis. **B)** Células del parénquima subepidérmico con paredes gruesas y muy vacuolizadas. **C y D)** Aspecto general de algunas células del parénquima cotiledonar con sus núcleos centrales dispuestos de manera ordenada. *Barra:* **A:** 11 μm , **B:** 14 μm , **C:** 22 μm , **D:** 16 μm .

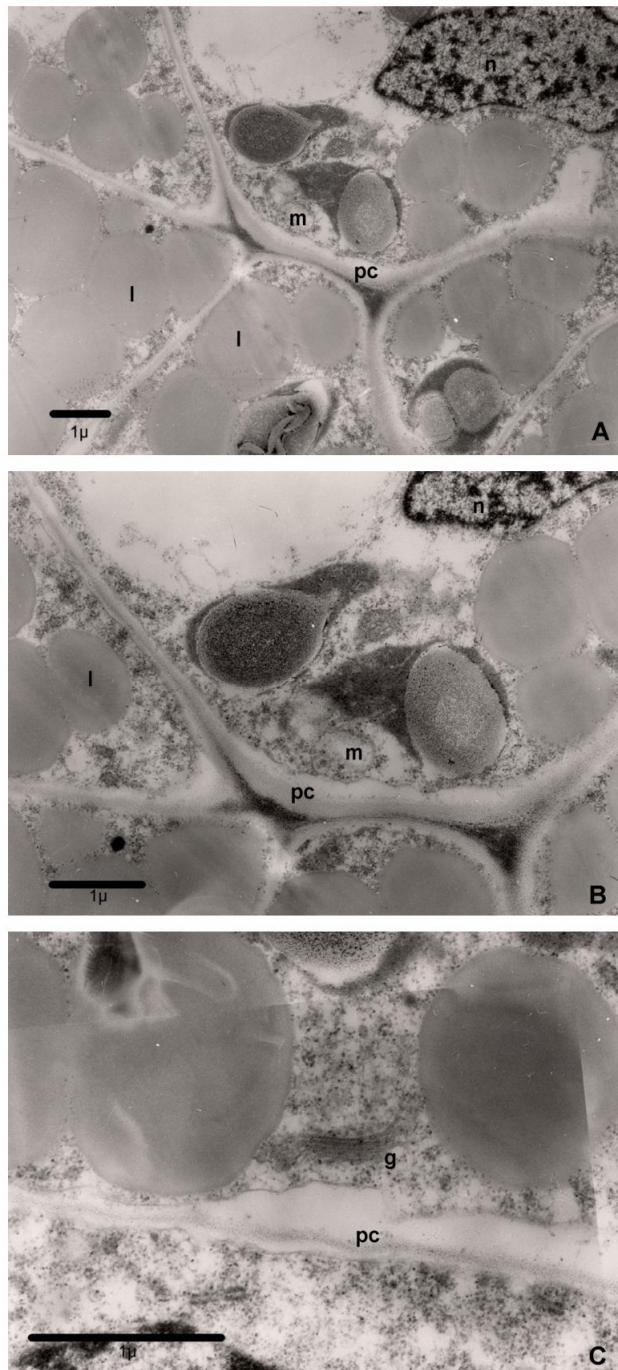


Figura 7. Fotos con MET de las células parenquimáticas de los cotiledones. **A)** Aspecto general, núcleos (n) conspicuos, mitocondrias (m) y abundantes glóbulos lipídicos (l). **B)** Detalle, pared celular (pc) gruesa, mitocondrias, plastidos con gránulos de almidón. **C)** Aparato de Golgi (g) y abundantes glóbulos lipídicos. *Barra:* 1 μ m.

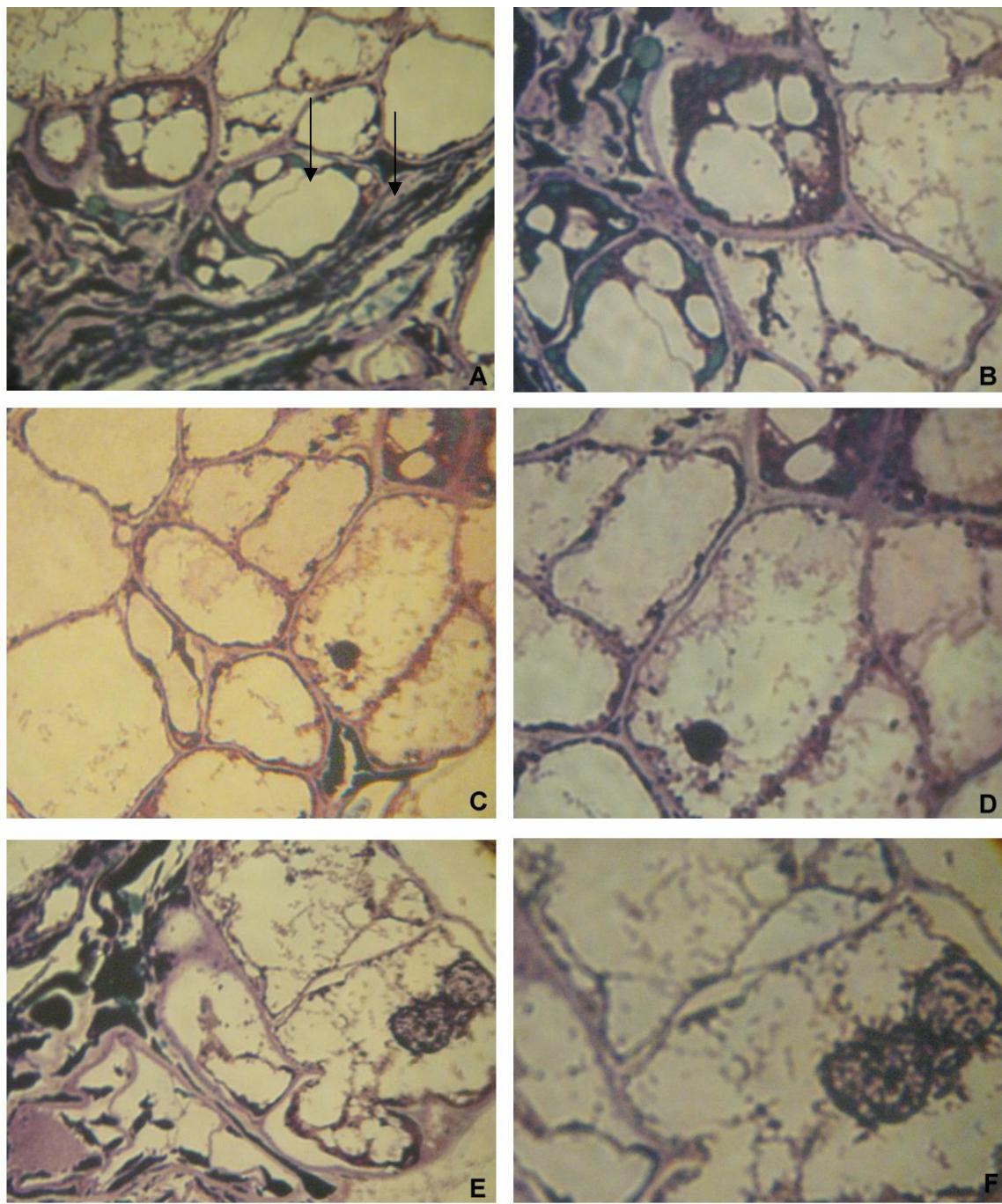


Figura 8. Embrión con cotiledones poco desarrollados. **A)** Células epidérmicas y sub-epidérmicas (flechas). **B)** Detalle de las células citoplasma denso parietal y muy vacuolizadas. **C)** Células del parénquima, con citoplasma muy reducido y muy vacuolizadas. **D)** Detalle de un núcleo en degradación. **E)** Células epidérmicas con gran cantidad de vacuolas. **F)** Detalle de una célula epidérmica con dos núcleos. *Barra: A-C, E: 16 µm; D, F: 10 µm.*

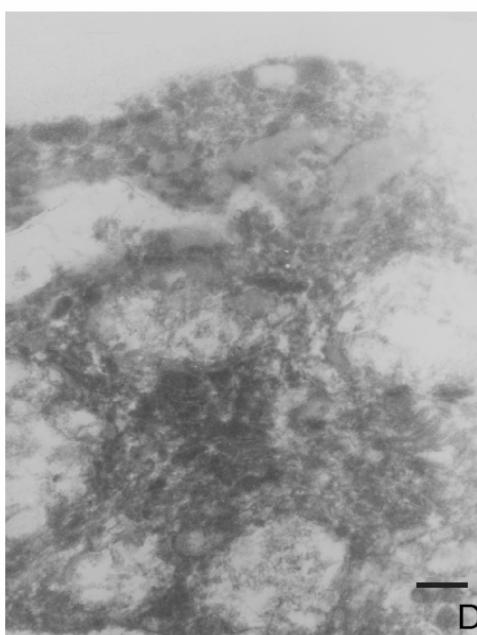
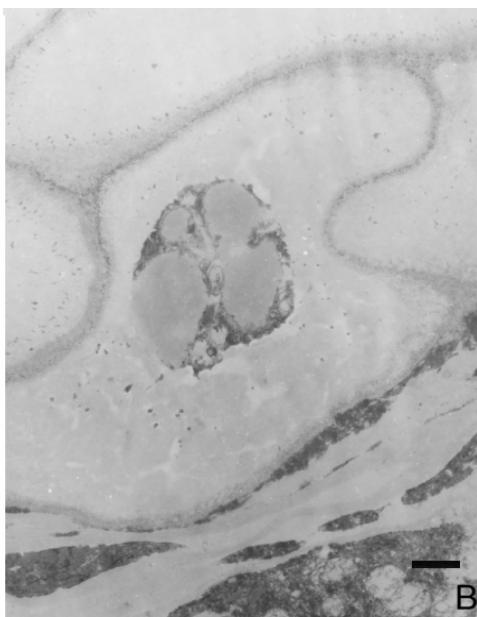
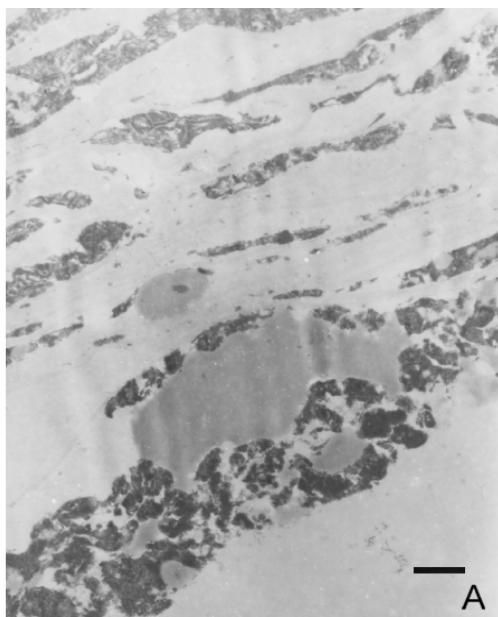


Figura 9. Fotos con MET. Embrión con sus cotiledones poco desarrollados. **A-D)** Células de los cotiledones. *Barra: 1 μ m.*

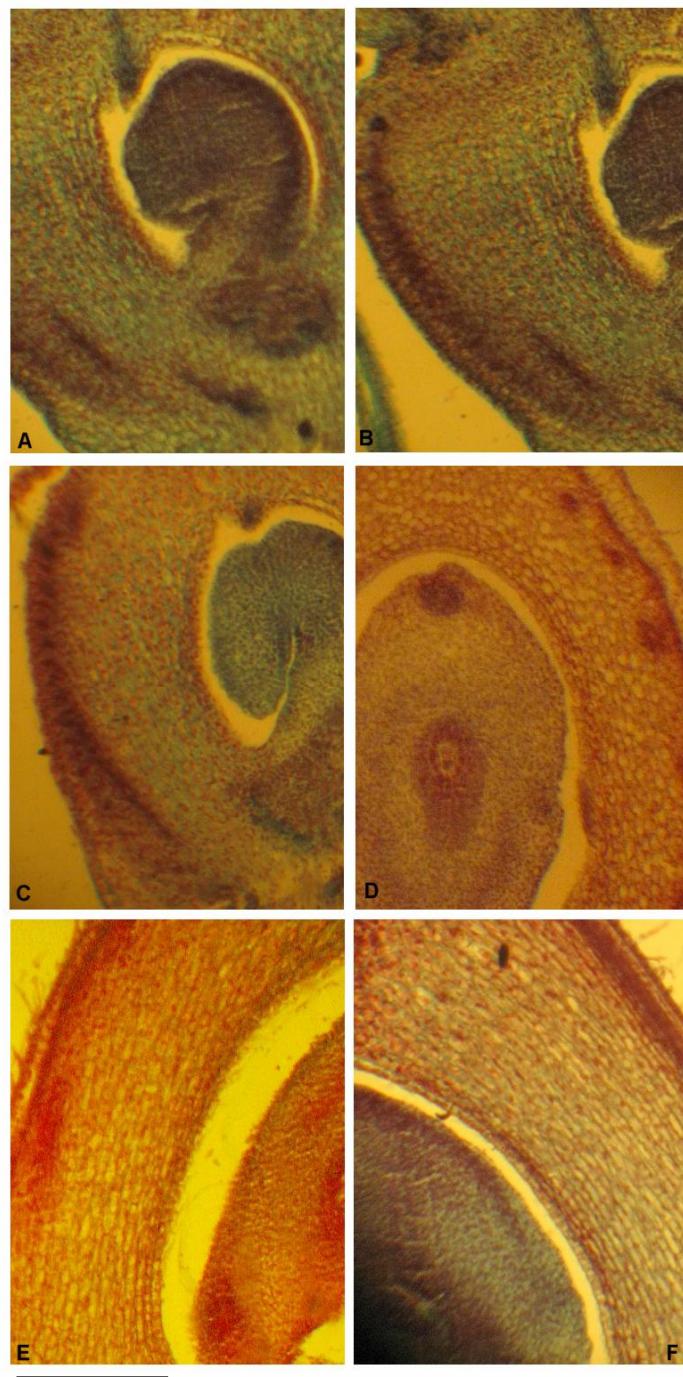


Figura 10. Desarrollo del pericarpo. **A)** Primordio ovular joven. **B)** Detalle. **C)** Estadio de CMM. **D)** Estadio de saco embrionario tetranucleado. **E)** Estadio de gametófito femenino joven. **F)** Estadio de gametófito femenino maduro. *Barra: A: 120 μ m; B: 100 μ m; C: 150 μ m; D: 130 μ m; E: 220 μ m; F: 200 μ m.*

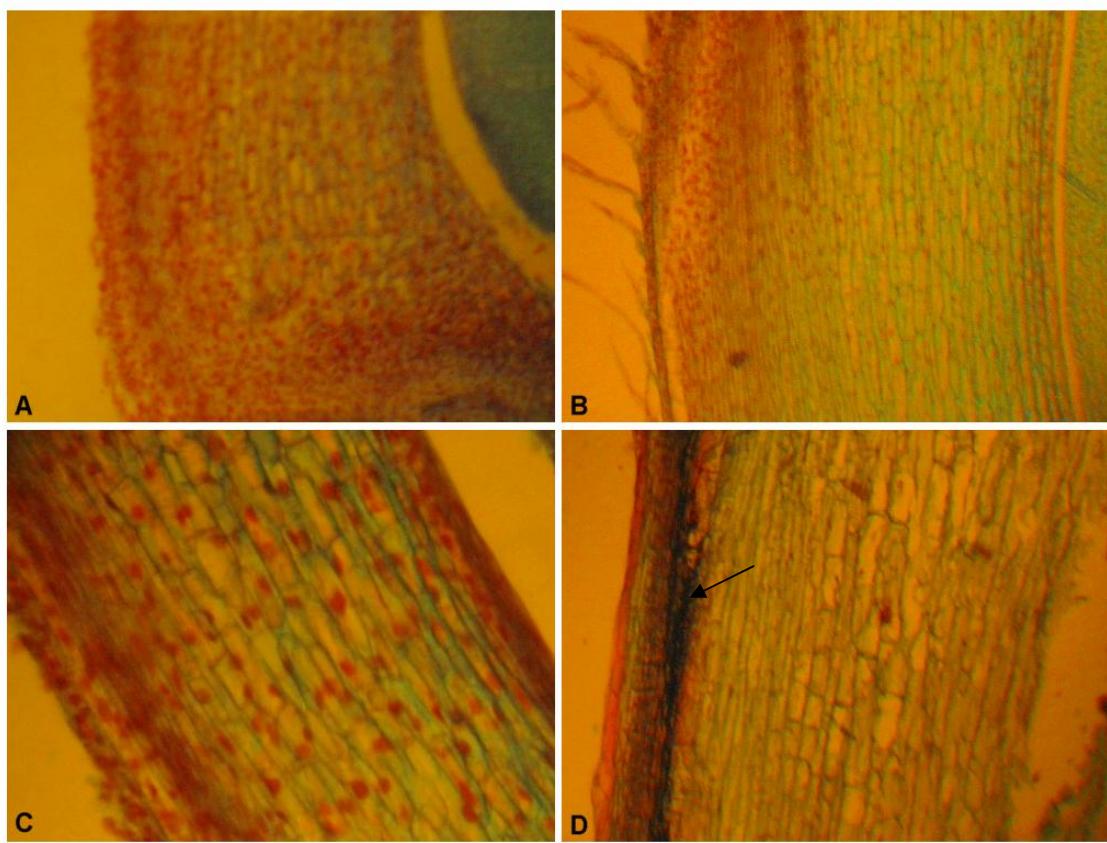


Figura 11. Desarrollo del pericarpo. **A)** Estadio de megagametófito fecundado. **B)** Estadio de embrión globular. **C)** Estadio de embrión cordiforme. **D)** Estadio de embrión torpedo, capa de fitomelanina (flecha). *Barra: 80 µm*

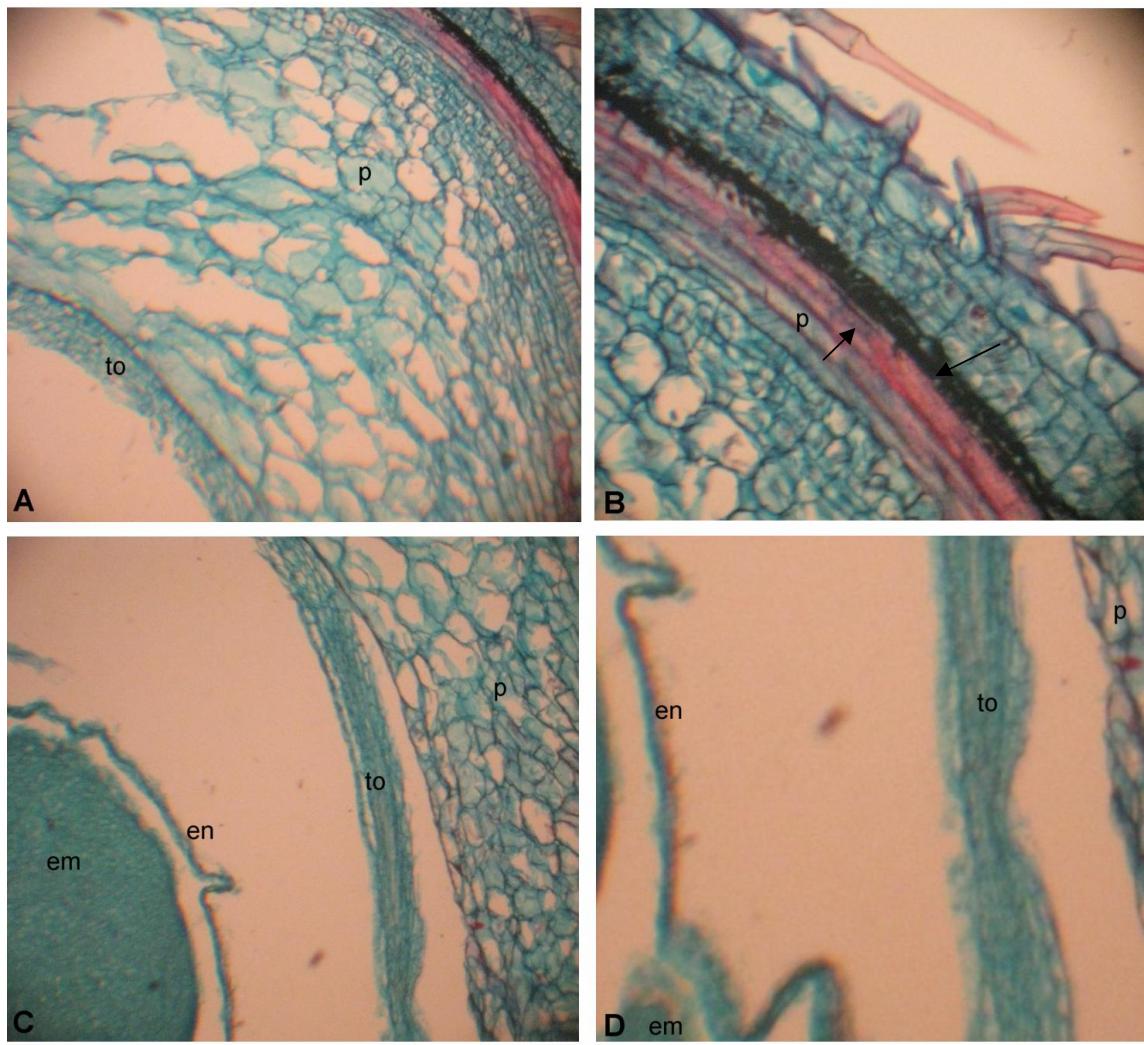


Figura 12. Desarrollo del pericarpo. **A)** Estadio de embrión maduro. Aspecto general del pericarpo (p) y del tegumento del óvulo (to). **B)** Detalle del pericarpo (p) con fibras (flecha) y capa de fitomelanina (flecha). **C)** Aspecto general de parte del embrión (em), del endosperma (en), del tegumento del óvulo (to) y del pericarpo (p). **D)** Detalle del endosperma (en) y del tegumento del óvulo (to). *Barra: A, C: 110 µm; B, D: 30 µm.*

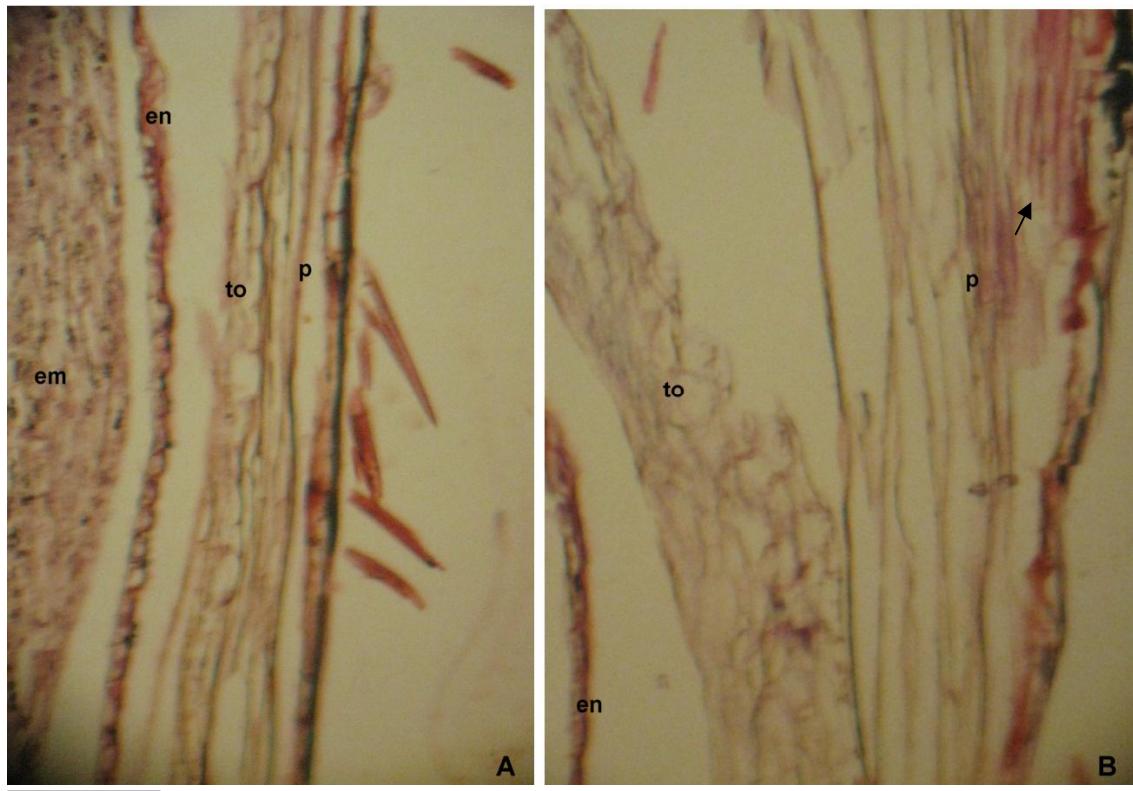


Figura 13. Pericarpo de un fruto con el embrión con los cotiledones poco desarrollados. Fotos con MO. **A)** Aspecto general donde se evidencian el embrión (em), el endosperma (en), el tegumento del óvulo (to) y el pericarpo (p). **B)** Detalle del endosperma (en), del tegumento del óvulo (to) y del pericarpo (p) con fibras (flecha). *Barra: A: 50 μ m, B: 22 μ m.*

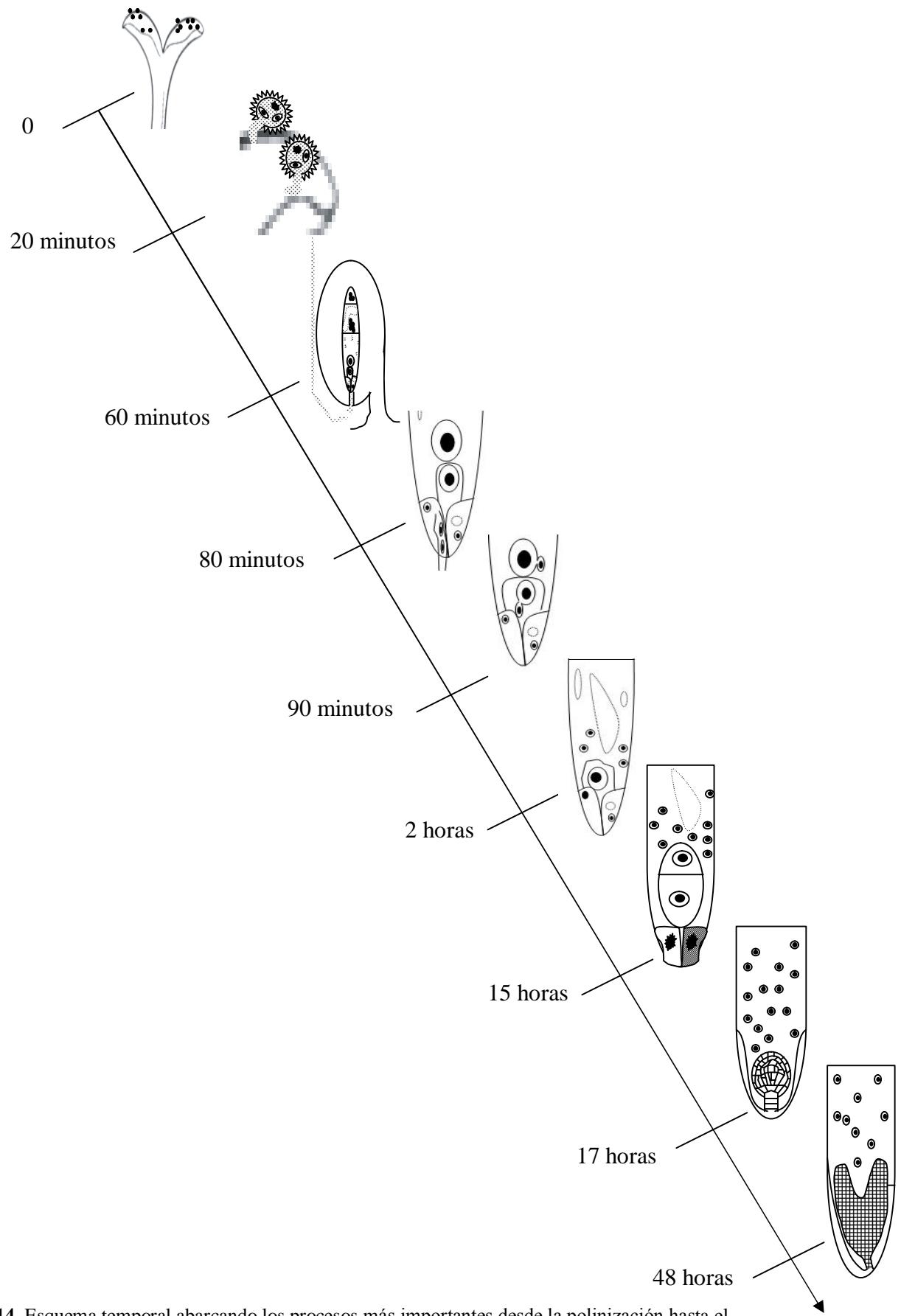


Figura 14. Esquema temporal abarcando los procesos más importantes desde la polinización hasta el estadio de embrión torpedo.

CAPITULO VIII

Efecto del estrés hídrico en la embriología del híbrido comercial DK 4050



8.1. Introducción.

El aborto de frutos es una de las causas más importantes de las mermas de rendimiento del girasol. De acuerdo con lo observado en capítulos anteriores, en plantas que crecen bajo condiciones óptimas el desarrollo de los megagametófitos no presenta anormalidades, por lo que se supone que todas las variantes de megagametófitos registradas estarían en condiciones de ser fecundadas y producir frutos viables. Por lo tanto el aborto de frutos debería ser adjudicado a otras causas.

El número de semillas, componente principal del rendimiento de los cereales y las oleaginosas, depende fuertemente del estado fisiológico del cultivo durante un período crítico en la formación del fruto (de la Vega *et al.*, 2001). Connors *et al.* (1992) realizaron estudios fisiológicos en girasol para analizar su rendimiento. Se sabe que el estrés hídrico impacta negativamente en el rendimiento de muchos cultivos (Stegman y Lemert, 1981; Plaut, 1995; Marin *et al.*, 2000; Al-Kaisi y Broker, 1992). Varios autores han analizado el llenado de granos y el mantenimiento del rendimiento en cultivos de girasol expuestos a sequía (Hall *et al.*, 1989; Whitfield *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1989, Hall *et al.*, 1990; Chimenti *et al.*, 2002), los que concluyeron que el rendimiento disminuye considerablemente en plantas estresadas en el estadio de embriones maduros. Sin embargo, nunca se hizo un estudio estrictamente embriológico sobre el efecto de la falta de agua en los distintos estadios de desarrollo en plantas de girasol.

En este capítulo se analiza el transcurso de la megasporogénesis y megagametogénesis en flores de girasol DK 4050 sometidas a estrés hídrico. Los

objetivos fueron complementar la caracterización embriológica ya disponible sobre las flores capaces de producir semillas viables, e identificar los estadios del desarrollo del megagametófito más sensibles al estrés hídrico. Se procuró correlacionar temporalmente los estados del desarrollo embriológico con los estados de desarrollo fenológico de la planta entera, a fin de facilitar el reconocimiento de los estadios críticos en condiciones de cultivo

8.2. Resultados

Los estadios embriológicos de las flores de la periferia y centro del capítulo de girasol en los que el estrés fue aplicado se detallan en la siguiente tabla. Los estadios de desarrollo del capítulo, de acuerdo a su morfología externa, fueron caracterizados siguiendo la barra de Schneiter y Miller (1981).

Tratamiento de estrés hídrico	Estadio de desarrollo en la periferia del capítulo	Estadio embriológico de las flores centrales	Estadio embriológico de las flores periféricas
T3	R2-R3 (<i>primordio floral</i>)	<i>Primordio ovular</i>	<i>primordio ovular</i>
T4	R4 (<i>pre – antesis</i>)	<i>Célula madre de las megásporas</i>	<i>Tétrade de magásporas</i>
T5	R5 (<i>anteras expuestas</i>)	<i>Tétrade de megásporas</i>	<i>Megagametófito joven</i>
T6	R6 (<i>estigmas expuestos</i>)	<i>Megagametófito binucleado</i>	<i>Megagametófito maduro</i>
T7	R7 (<i>post – antesis</i>)	<i>Megagametófito maduro</i>	<i>Gametófito fertilizado</i>
T8	R9 (<i>grano maduro</i>)	<i>Pro-embrión</i>	<i>Embrión maduro</i>

Tabla 1. Estadios embriológicos de flores de la periferia y centro de capítulos de girasol en los que el estrés fue aplicado. Los estadios de desarrollo correspondientes del capítulo fueron caracterizados siguiendo la barra de Schneiter and Miller (1981)

8.2.1. Microsporogénesis y microgametogénesis

El estrés hídrico no provocó ningún efecto sobre estos procesos ya que la microsporogénesis y la microgametogénesis habían finalizado antes de que se aplicara el tratamiento más temprano (T3).

8.2.2. Megasporogénesis y megagametogénesis.

No se observaron diferencias embriológicas entre T1, T2 (grupos control) y T3. En estos tres grupos de plantas todos los estadios de la megasporogénesis y megagametogénesis coinciden con los informados para este híbrido en el capítulo IV. Por lo tanto, las descripciones están concentradas en los cambios embriológicos observados en las plantas de los grupos T4 a T8, que sí fueron afectadas por el tratamiento de estrés (Tabla 1). Se realiza una única descripción para las flores del medio, centro y periferia del capítulo. En caso de existir diferencias éstas se detallan de manera específica.

La megasporogénesis sigue su curso normal en todos estos tratamientos (Fig. 1 A-E). Sin embargo, las flores centrales de T6 presentan sacos embrionarios binucleados y tetranucleados por un tiempo más prolongado que los grupos control, y alcanzan un tamaño mayor (85 μm) que los mismos observados en los grupos control y en T4 (66 μm) (Fig. 1E-G).

En los controles, luego de la última cariocinesis mitótica se produce la citocinesis que resulta en un gametófito femenino de seis células formado por un aparato oosférico, la célula central y dos antípoda uninucleadas. En T4, la cantidad de núcleos en cada antípoda aumenta con la maduración del megagametófito (Fig. 3A-D, 18A). La mayoría de los gametófitos femeninos jóvenes de T5 presentan únicamente dos antípoda con uno a varios núcleos cada una (Fig. 6A) y el número de núcleos en estas células puede o no aumentar a medida que el gametófito madura. En todos los tratamientos, los megagametófitos maduros con dos antípoda son los más frecuentes (Figs. 3A, B, 4B, 6D, 7A-C, 8A-C, 9A-C, 10A-B, 12A-D, 14A-C, 15A-C), sin embargo, también se han encontrado gametófitos femeninos con tres antípoda (Figs. 2D, 4C, 5C, 6C, 10C).

En algunos gametófitos las antípoda presentan paredes muy gruesas (Fig. 18B). Estas pueden encontrarse separando a las antípoda entre sí y a éstas de la célula media (Figs. 3C, 5B, 6A-C, 7B, C, 8A-C, 9A-C, 10A-C, 12A-D, 13A-C, 14A-C, 15A-C), separando solamente a la antípoda micropilar de la célula media (Figs. 5A, 6D), entre la antípoda micropilar y la célula media y además separando la antípoda calazal (Fig. 6C), o simplemente en la antípoda del extremo calazal (Fig. 3A). Dichas paredes están comúnmente presentes en los gametófitos de todos los tratamientos, excepto en los de T4, donde sólo aparecen ocasionalmente (Fig. 2C) mientras que en algunos megagametófitos de T5 están ausentes (Fig. 4B).

La célula media joven posee dos núcleos polares cercanos entre sí (Figs. 2B, C, 4A). Generalmente estos núcleos se fusionan tempranamente, antes de que el gametófito

comience a elongarse (Figs. 2D, 3A-C, 4B, C, 5A-C, 6A-D, 7A, 8B, 12A-C). El núcleo polar secundario, en la mayoría de los gametófitos, es relativamente grande con un nucleolo muy conspicuo, el cual puede presentar vacuolas nucleolares (Figs. 3A-C, 4C, 5A-C, 6A, B, D, 7B, C, 8B, C, 9B, C, 12A, C, D, 13A, C, 14A, 15A, C). Las flores de T5, T6 y T7 desarrollan megagametófitos con más de un nucleolo en sus núcleos polares (Figs. 13C, 15C). El núcleo secundario puede estar ubicado en el extremo micropilar de la célula media (Figs. 3C, D, 4B, 6A-D, 7A-C, 8B, C, 9A-G, 14A, 15B, C), o, en el medio de la misma (Figs. 2D, 3A, 6A, 12A, B, 15A). En algunas flores de T5, se observan gametófitos con conexiones entre el citoplasma de la célula media y el de la oosfera (Figs. 7C, 9A, C).

La gran vacuola de la célula media joven puede mantenerse como tal (Figs. 2D, 3A, 9B, C, 13C) o pueden formarse numerosas vacuolas pequeñas (Figs. 3B, C, 4C, 5A-C, 6A, 7A-C, 8A-C, 9A, 12A-D, 13A-B, 14A, 15A-C). En T4 se forman gametófitos femeninos anormales y extremadamente largos (785 μm) con dos vacuolas grandes empujando al núcleo hacia el centro de una gran célula media, y numerosas vacuolas pequeñas dispersas en el citoplasma de la misma (Fig. 3D). En algunas de las flores de T5 se observan megagametófitos maduros con los núcleos polares sin fusionar (Fig. 8A, 18C). En T6, se desarrollan algunos gametófitos anómalos con una célula central de gran tamaño muy vacuolizada (Fig. 18D), o bien con un citoplasma denso y pocas vacuolas (Fig. 13B).

Hay una gran variabilidad entre tratamientos en cuanto a la morfología de las sinérgidas. En los gametófitos femeninos jóvenes estas células pueden ser cortas, con un

citoplasma denso y núcleos prominentes (Fig. 2A, B) o bien notablemente largas (Fig. 2C). Sin embargo, en los megagametófitos jóvenes de T5 solo se observan sinérgidas largas (Fig. 4A) que no difieren mucho en longitud de las del gametófito maduro (Figs. 4B, C, A-C, 6A-D, 7A-C, 8A-C, 9A-C). Las sinérgidas de los gametófitos femeninos maduros pueden permanecer cortas (Fig. 2E, D), pueden alcanzar un tamaño intermedio (Figs. 12A, B, 13B, C, 15C) o pueden prolongarse hacia el extremo micropilar (Figs. 3B, C, 12C, D, 15A, B). Cuando estas células alcanzan su tamaño máximo, los núcleos pueden encontrarse ubicados en distintas posiciones: en la parte media (Figs. 4C, 5B, C, 6A, C, 7C, 9B, 12C), en el extremo micropilar (Figs. 4B, 9A) o en la región calazal (Figs. 3B, C, 5A, 6B, D, 8C, 9C, 12D, 13B, 15B, C). Las sinérgidas comienzan a degradarse una vez producida la fertilización (Fig. 14C). Sin embargo, en T6 se observan gametófitos femeninos sin fertilizar cuyas sinérgidas ya se han degradado (Fig. 13A).

La oosfera difiere en morfología, tamaño y vacuolización entre tratamientos y dentro de ellos. Pueden ser pequeña con una vacuola calazal (Fig. 12B), oblonga con algunas vacuolas pequeñas (Figs. 6A, 12C, 13A, 15A), algo elongada hacia el extremo micropilar y con una vacuola en dicho extremo (Figs. 3B, C, 4B, 5B, C, 6B-D, 7A, B 8B, C, 9A-C, 12A, D) o de un tamaño intermedio con citoplasma denso (Figs. 3A, 13B, C, 15B).

El gametófito femenino joven de T4 varía considerablemente de tamaño (110 μm a 289 μm) mientras que en T5 y T6 es de un tamaño intermedio (210 μm) si se compara con los gametófitos en el mismo estadio de desarrollo de los grupos control.

8.2.3. Fertilización y desarrollo del embrión.

La fertilización sigue su curso normal en todos aquellos tratamientos en los que el estrés se aplicó antes que ésta ocurriera (T3-T5) (Fig. 14A). El desarrollo del embrión corresponde al tipo Asteráceo (Fig. 10A-C). Restos de las sinérgidas pueden ser observados aún en el estadio de embrión globular (Figs. 10A-C). La endospermogénesis no muestra diferencias con los grupos control (Figs. 10A, B, 11A, B) y a medida que el embrión crece, comienza la celularización del endosperma formando dos capas de células (Figs. 11A, B, 16A). Sólo en T5 aparecen algunos casos anormales, en los cuales el núcleo endospermogénico no se divide y se encuentra presente aún en el estadio de embrión globular (Figs. 10C, 18E, F).

Las flores de los tratamientos T6, T7 y T8 estuvieron bajo el efecto del estrés hídrico durante la fertilización y/o el desarrollo del embrión (Tabla 1). En T6 se desarrollan megagametófitos en los cuales el núcleo polar secundario comienza a dividirse antes de la fertilización, para formarse luego núcleos de restitución (Fig. 14B).

En las flores de T7, numerosos gametófitos no fueron fertilizados y comienzan un lento proceso de degradación (Figs. 16C, D, 19A, B). Los megagametófitos fertilizados pero inviables presentan degradación de los núcleos del endosperma, del cigoto y de las antípodas (Figs. 16B, 19D).

La mayoría de los megagametófitos en T8 se observan no funcionales y en vías de degradación. Los megagametófitos no viables son extremadamente largos (831 μm),

con una célula media de gran tamaño y antípodas y sinérgidas que son las últimas en degradarse, ya que mantienen sus núcleos distinguibles por más tiempo (Figs 17, 19E, F). En este mismo tratamiento se observaron varios embriones abortando en distintos estadios de desarrollo (Fig. 19C)

Todos los casos descriptos, en los cuales ocurren anormalidades en el desarrollo del embrión y/o del endosperma, ocurren en gametófitos femeninos que tienen tres antípodas, o bien dos antípodas uninucleadas y/o antípodas que no presentan paredes gruesas entre ellas (Figs. 10C, 14B).

8.2.4. Efecto del estrés hídrico sobre el rendimiento

Los grupos control (T1 y T2) y los del tratamiento T3 produjeron cerca del 80% de frutos viables. El porcentaje de los mismos bajó al 65% en T4, T5 y T6, al 55% en T7 y al 42% en T8.

8.3. Discusión

La influencia del estrés hídrico en el desarrollo embriológico del girasol es claramente dependiente del estadio de desarrollo de la flor en el que el estrés es aplicado. El estrés no tiene ningún efecto sobre la esporogénesis y gametogénesis cuando se aplica en estadios florales tempranos (primordio floral), y la extensión del daño aumenta cuando las plantas son tratadas durante y después de la exposición de los estigmas de cada flor. Esto implica que cuanto más avanzado esté el estado del capítulo, esto es mayor número de flores con sus estigmas expuestos, el daño será superior.

Las alteraciones en el curso normal de la embriología se detectaron a partir del cuarto tratamiento. En una baja proporción de las flores estresadas en T4, el número de antípodas, que por lo general es dos, aumentó a tres, o bien las mismas no desarrollaron paredes celulares gruesas. Estas anormalidades incrementaron su frecuencia en T5 pero no se encontraron en T6, T7 y T8. Las flores estresadas en T5 se encontraban en su mayoría en megasporogénesis, momento donde ocurre la meiosis, mientras que en las flores de T6-T8 este proceso ya había ocurrido. Esto sugiere que el estrés aplicado durante la meiosis impulsa la formación de gametófitos femeninos con tres antípodas. Estos gametófitos son propensos a un desarrollo posterior anómalo. Por ejemplo, una vez ocurrida la fertilización, los megagametófitos que poseían más de dos antípodas, y en los que estas tenían sólo uno o dos núcleos cada una y carecían de paredes gruesas entre ellas, resultaron consistentemente asociados a imposibilidad del núcleo endospermogénico para dividirse en el estadio de embrión globular. En T6, los gametófitos femeninos cuyas antípodas tenían solamente uno o dos núcleos presentaban el núcleo polar secundario dividido antes de la fertilización. En todos los casos, los

gametófitos con proembiones y endosperma normales tenían solo dos antípodas con numerosos núcleos cada una y paredes rotundas.

El estrés hídrico indujo el alargamiento de los megagametófitos jóvenes. Los sacos embrionarios tetranucleados de las plantas estresadas en T4 eran más largos que aquellos de los grupos control. La longitud de los sacos embrionarios se incrementó más en flores de T5 y aún más en las de T6. La observación detallada de los gametófitos extremadamente largos sugiere que éstos son propensos a abortar.

En gametófitos femeninos jóvenes las sinérgidas son por lo general cortas, con un citoplasma denso, y crecen a medida que el megagametófito madura. Las plantas estresadas en T4, T5 y T6 poseen sinérgidas muy elongadas, las cuales no fueron observadas en los grupos control ni en T3. Sólo en unos pocos casos de flores estresadas en T6 y T7 las sinérgidas se mantuvieron cortas y anchas.

Las sinérgidas normalmente comienzan a degradarse después de la fertilización. Sin embargo, en algunos gametófitos de T6 se observaron sinérgidas que comenzaron a degradarse antes de dicho proceso.

Los núcleos polares de la célula media de gametófitos de flores de T5 tardaron más en fusionarse que en los grupos control o incluso no llegaron a hacerlo. El núcleo polar secundario generalmente es muy conspicuo y se observa con más de un nucleolo en las plantas estresadas en T6 y T7. Se observaron conexiones entre el citoplasma de la célula media y el de la oosfera en algunas plantas de T5. Esta relación cercana ha sido

observada previamente por Yan *et al.* (1990) en plantas de girasol no estresadas.

En las flores de T6 y T7 se encontraron varios gametófitos femeninos que iniciaban su degradación como consecuencia de una falla en el proceso de fertilización o de ausencia de fertilización. Algunos megagametófitos fertilizados de T6, T7 y T8 también se observaron en proceso de aborción probablemente como respuesta a un desarrollo anormal del embrión o del endosperma presumiblemente causado por el estrés hídrico.

Se puede concluir que el estrés hídrico tiene poco efecto cuando se produce durante los primeros estadios de desarrollo floral de girasol, mientras que induce la formación de megagametófitos con más de dos antípodas si el estrés se aplica inmediatamente antes de la meiosis o durante la misma, y retarda el desarrollo del megagametófito cuando es aplicado en el estadio de saco embrionario binucleado. Pero el mayor nivel de aborto se observa cuando el estrés se aplica en el estadio de megagametófito maduro y/o de pro-embrión joven. Aunque todas las variantes de los gametófitos femeninos que se describieron en este trabajo pueden potencialmente ser fertilizados, únicamente aquellos con dos antípodas multinucleadas y paredes gruesas prosperan hasta formar embrión y endosperma normales. Esta es una contribución importante a la caracterización anatómica de las flores de girasol que desarrollan semillas viables.

Se ha mostrado repetidamente que el rendimiento del girasol disminuye cuando el estrés hídrico es aplicado en los últimos estadios del desarrollo de las flores y de los

frutos (Stegman y Lemert, 1981; Hall *et al.*, 1989; Whitfield *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1990; Plaut, 1995; Marin *et al.*, 2000; Chimenti *et al.*, 2002), hecho que fue corroborado en este trabajo. Los resultados aquí expuestos sugieren fuertemente que por lo menos parte de estas pérdidas en el rendimiento son consecuencia de un desarrollo embriológico anómalo causado por el estrés. Sin embargo, estudios cuantitativos son necesarios para establecer inequívocamente cuánto de la pérdida total se debe a causas embriológicas. Un estudio posterior que muestre la proporción de anormalidades asociadas a la falta de fertilización en cada tratamiento debería ser el próximo paso a seguir.

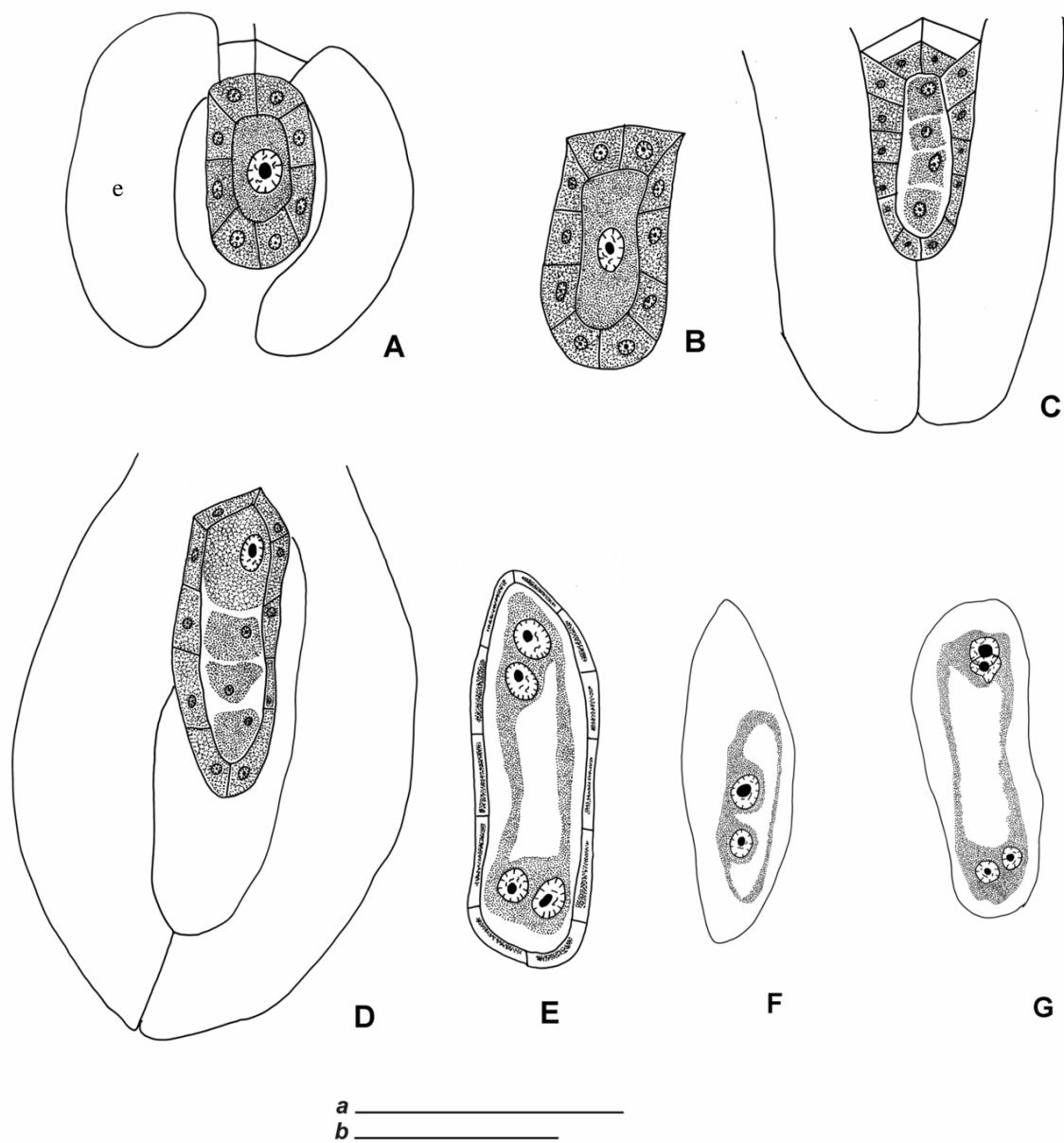


Figura 1. Megasporogenesis y megagametogenesis. **A-E.** T4. **A)** Ovulo tenuinucelado, célula madre de las megásporas, endotelio. **B)** Célula madre de las megásporas y epidermis nucelar, sin endotelio. **C)** Tétrade de megásporas lineal. **D)** Tétrade de megásporas lineal, megáspora calazal funcional. **E)** Saco embrionario tetranucleado. **F-G.** T6. **F)** Saco embrionario binucleado. **G)** Saco embrionario tetranucleado. *Barras:* 50 µm, A-E: barra a; F, G: barra b.

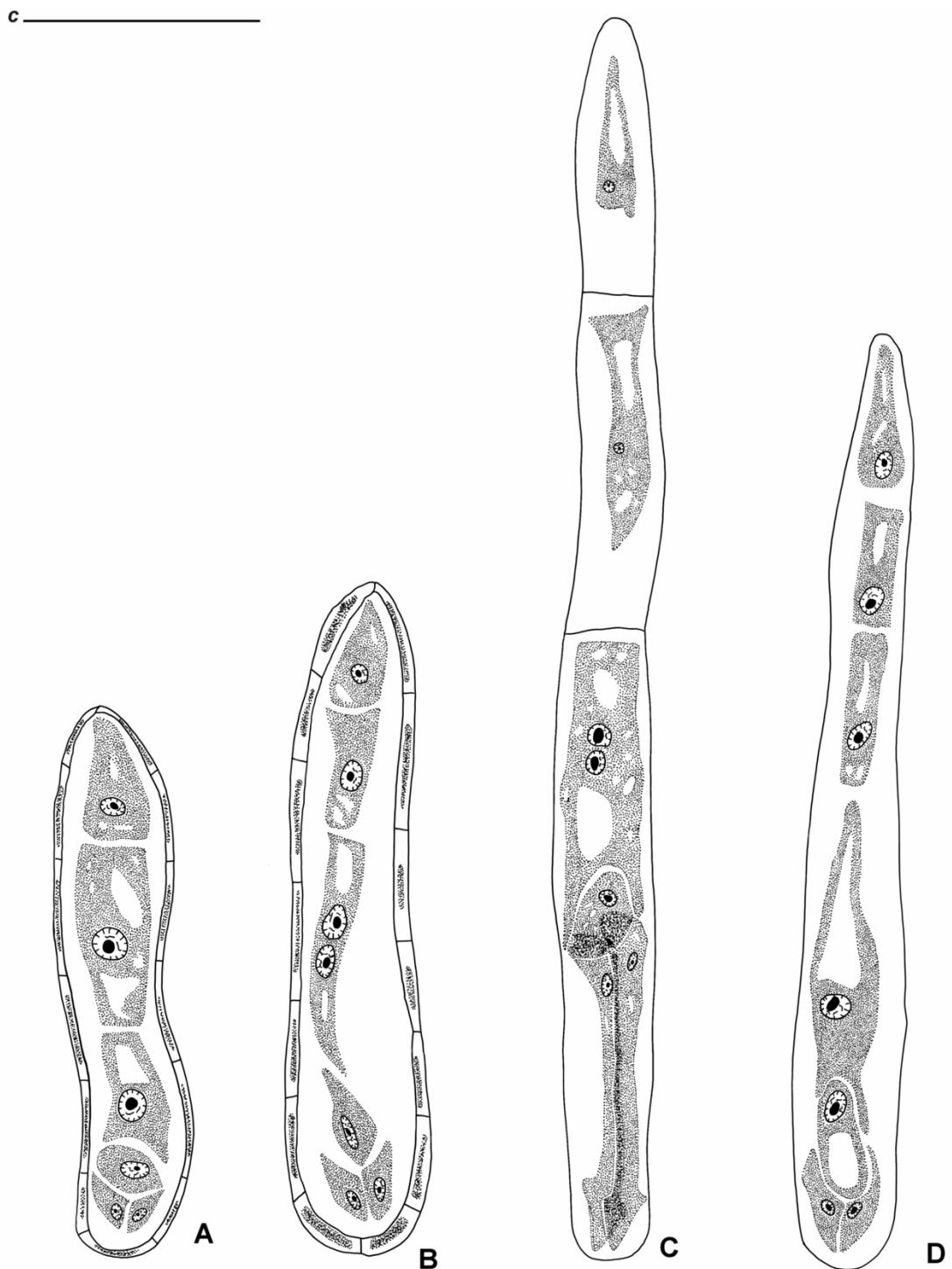


Figura 2. Megagametófito, T4. **A)** Gametófito femenino joven, nucela presente, núcleos polares fusionados, dos antípodas con un núcleo cada una. **B)** Megagametófito joven, con siete núcleos y seis células, nucela presente, núcleos polares sin fusionarse. **C)** Megagametófito joven largo, con sinérgidas muy elongadas, núcleos polares sin fusionarse, dos antípodas mononucleadas con paredes gruesas. **D)** Gametófito femenino joven con tres antípodas mononucleadas, sin nucela. *Barra: 50 µm.*

a _____
 b _____
 c _____

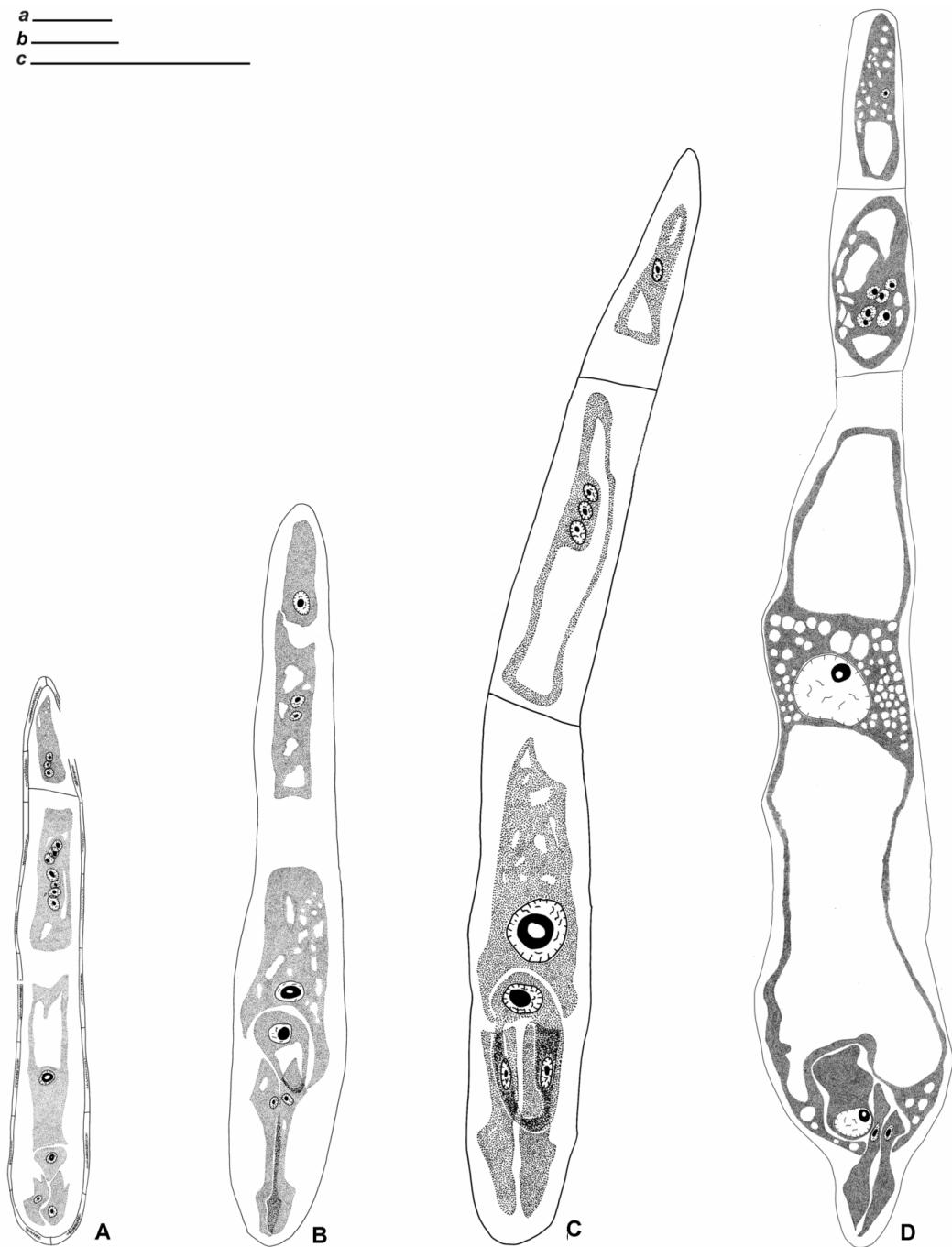


Figura 3. Megagametófito, T4. **A)** Gametófito femenino joven, dos antípodas multinucleadas, una pared rotunda entre ellas. **B)** Sinérgidas elongadas, dos antípodas, la micropilar con dos núcleos y la calazal con uno. **C)** Sinérgidas con núcleos calazales, oosfera con una vacuola micropilar, célula media con un núcleo conspicuo y una vacuola nucleolar, dos antípodas con paredes gruesas. **D)** Gametófito femenino muy grande, probablemente no funcional, sinérgidas con un citoplasma denso, oosfera sin vacuolas y con el núcleo micropilar, célula media larga y muy vacuolizada, con un núcleo muy conspicuo en posición central, dos antípodas con paredes rotundas. *Barras:* 50 μ m, **A, B:** barra *b*; **C:** barra *c*; **D:** barra *a*.

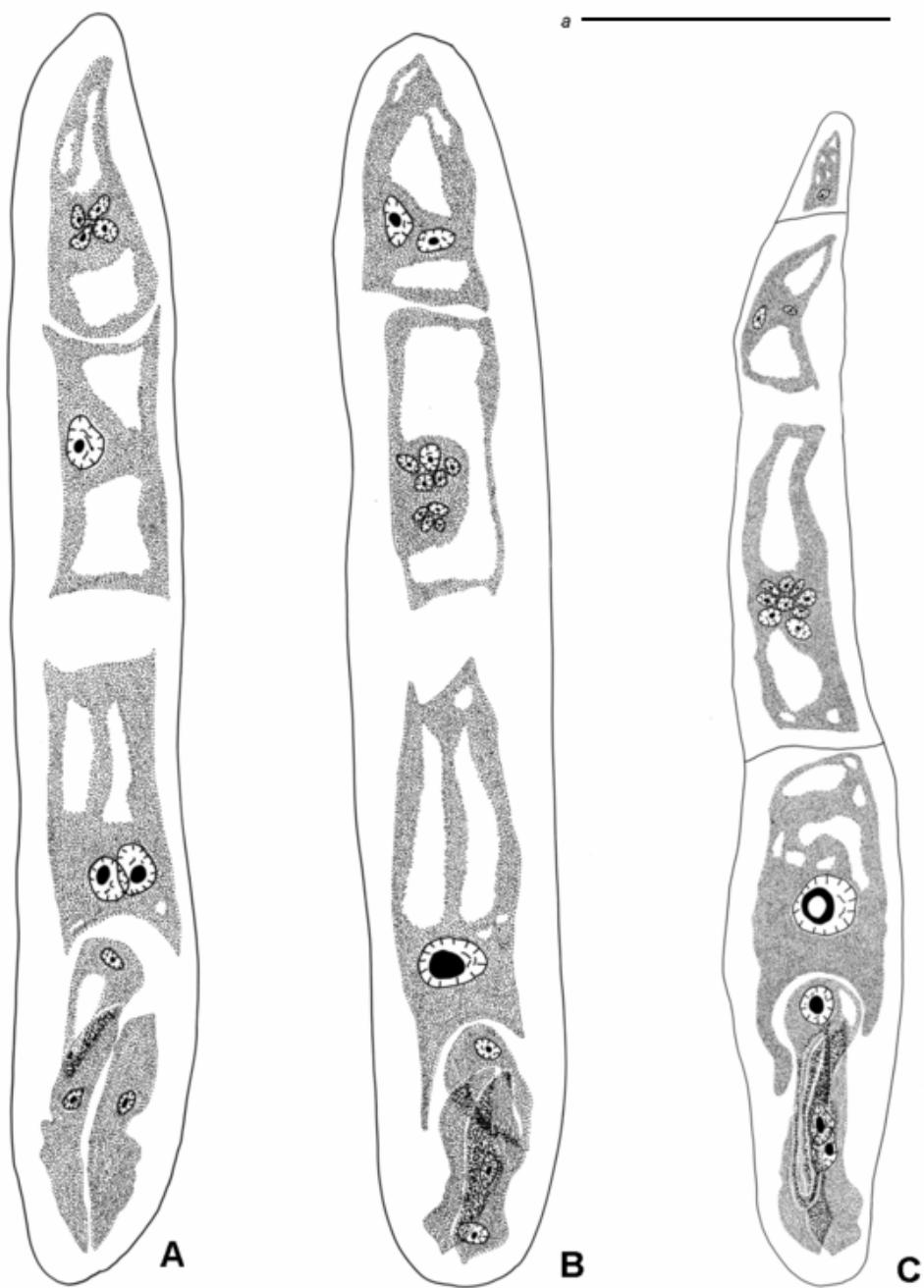


Figura 4. T5. **A)** Megagametófito joven, núcleos polares no fusionados, dos antípodas, la calazal con cuatro núcleos y la otra con uno. **B)** Megagametófito joven, sinérgidas con núcleos micropilares a calazales, oosfera con núcleo calazal y vacuola micropilar, célula media con núcleo conspicuo, dos antípodas multinucleadas. **C)** Gametófito femenino maduro, oosfera con escasas vacuolas pequeñas, célula media con pequeñas vacuolas calazales, tres antípodas grandes vacuolas cada una, paredes gruesas entre la célula media y la antípoda micropilar y separando la antípoda calazal. *Barra: 50 µm*

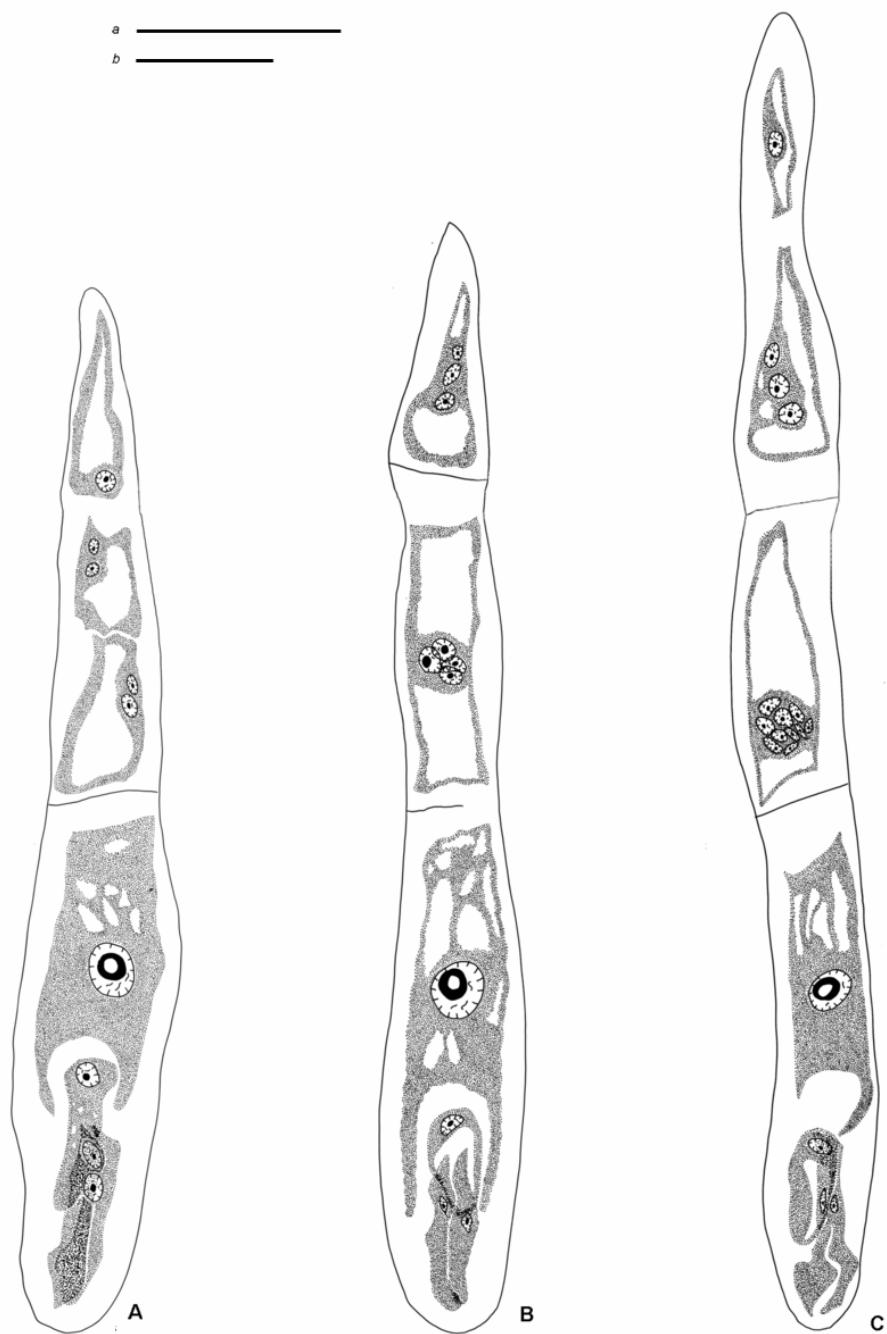


Figura 5. T5. **A)** Gametófito maduro, oosfera y sinérgidas elongadas hacia el extremo micropilar, tres antípodas, pared gruesa entre la célula media y la antípoda micropilar. **B)** Megagametófito con dos antípodas y paredes gruesas entre ellas y la célula media. **C)** Gametófito femenino más largo, sinérgidas delgadas, tres antípodas, la calazal con un único núcleo, paredes gruesas en la antípoda micropilar.

Barras: 50 μ m; **A:** barra *b*; **C, D:** barra *a*.

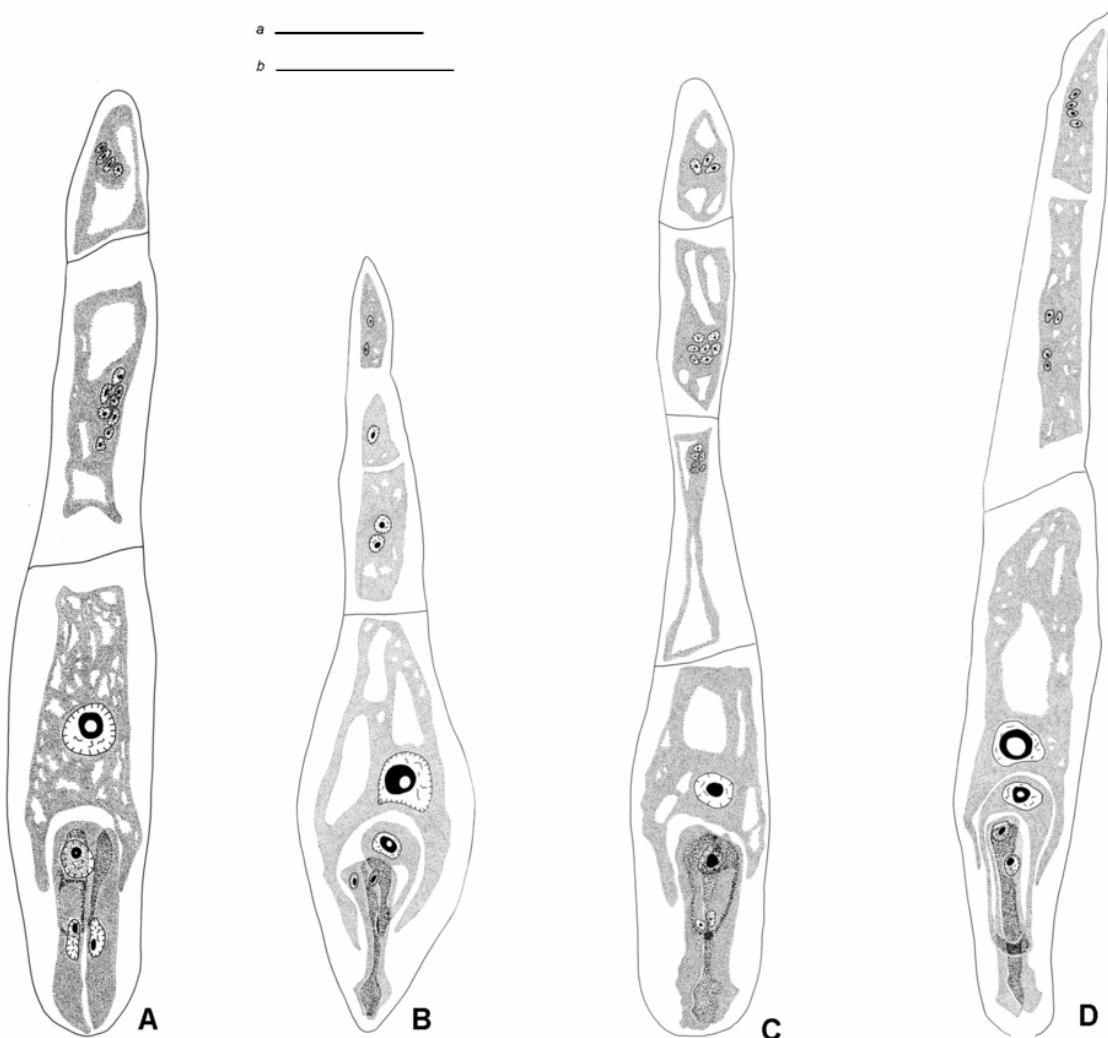


Figura 6. T5. **A)** Megagametófito maduro, sinérgidas con un núcleo conspicuo, célula media con numerosas vacuolas pequeñas, dos antípodas multinucleadas con paredes rotundas. **B)** Megagametófito maduro, sinérgidas elongadas con núcleos calazales pequeños, célula media con un núcleo conspicuo, tres antípodas, pared rotunda entre la micropilar y la célula media. **C)** Gametófito femenino maduro, tres antípodas con paredes rotundas, sinérgidas con núcleos pequeños. **D)** Oosfera y sinérgidas elongadas hacia el extremo micropilar, sinérgidas con núcleos calazales, oosfera larga, célula media con núcleo conspicuo y un gran vacuola nucleolar, dos antípodas con un pared rotunda entre la micropilar y la célula media. *Barras: 50 µm; A: barra a; B-D: barra b.*

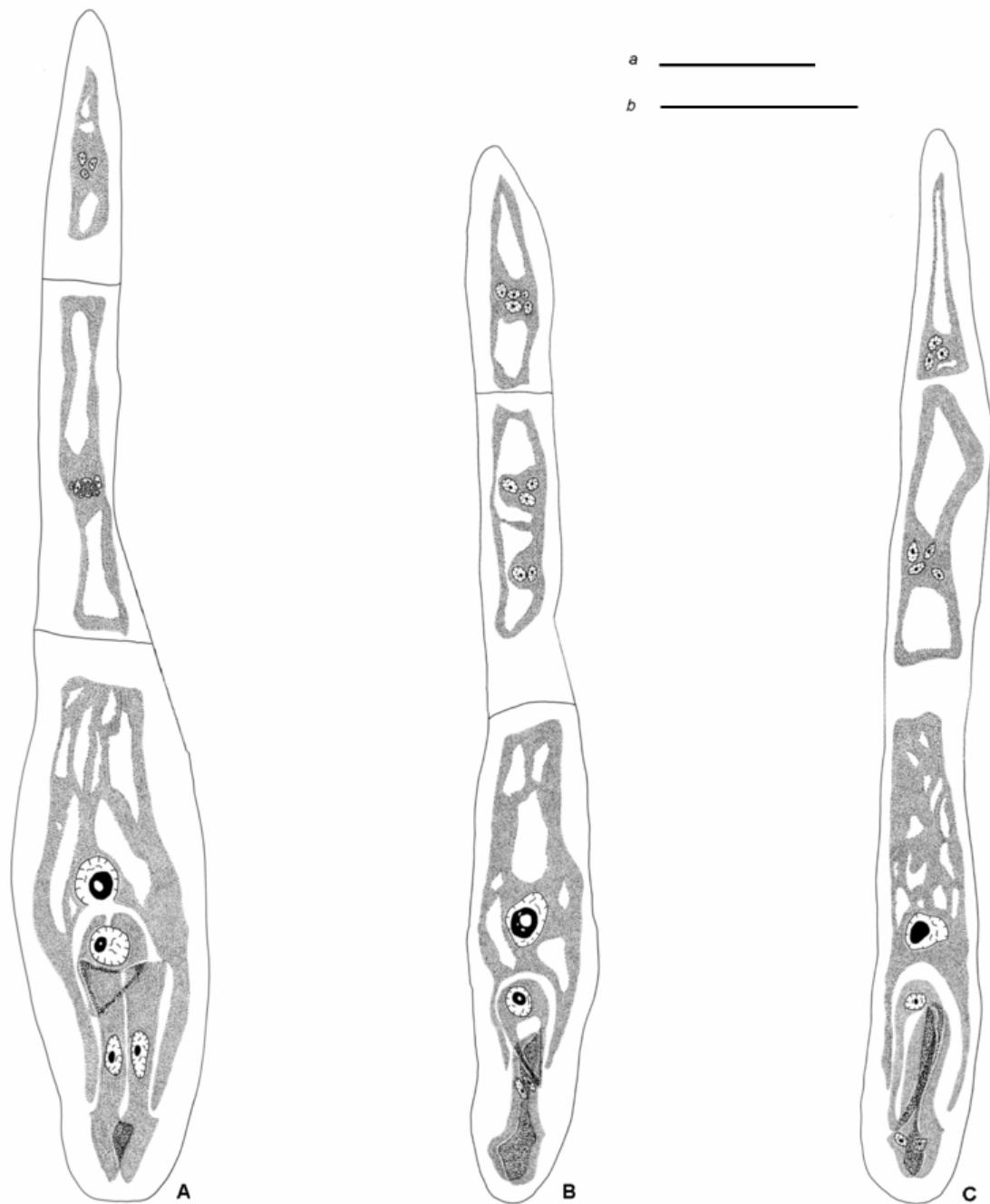


Figura 7. T5. **A)** Sinérgidas y oosfera elongadas hacia la micrópila, oosfera con núcleo pequeño, dos antípodas. **B)** Megagametófito, oosfera pequeña, núcleo polar secundario prácticamente conectado al citoplasma de la célula media, dos antípodas con paredes gruesas. **C)** Gametófito femenino más largo, sinérgidas con núcleos pequeños, núcleo polar secundario con algunas vacuolas nucleolares, dos antípodas con paredes rotundas. *Barras:* 50 μm ; **A, C:** barra *a*; **B:** barra *b*.

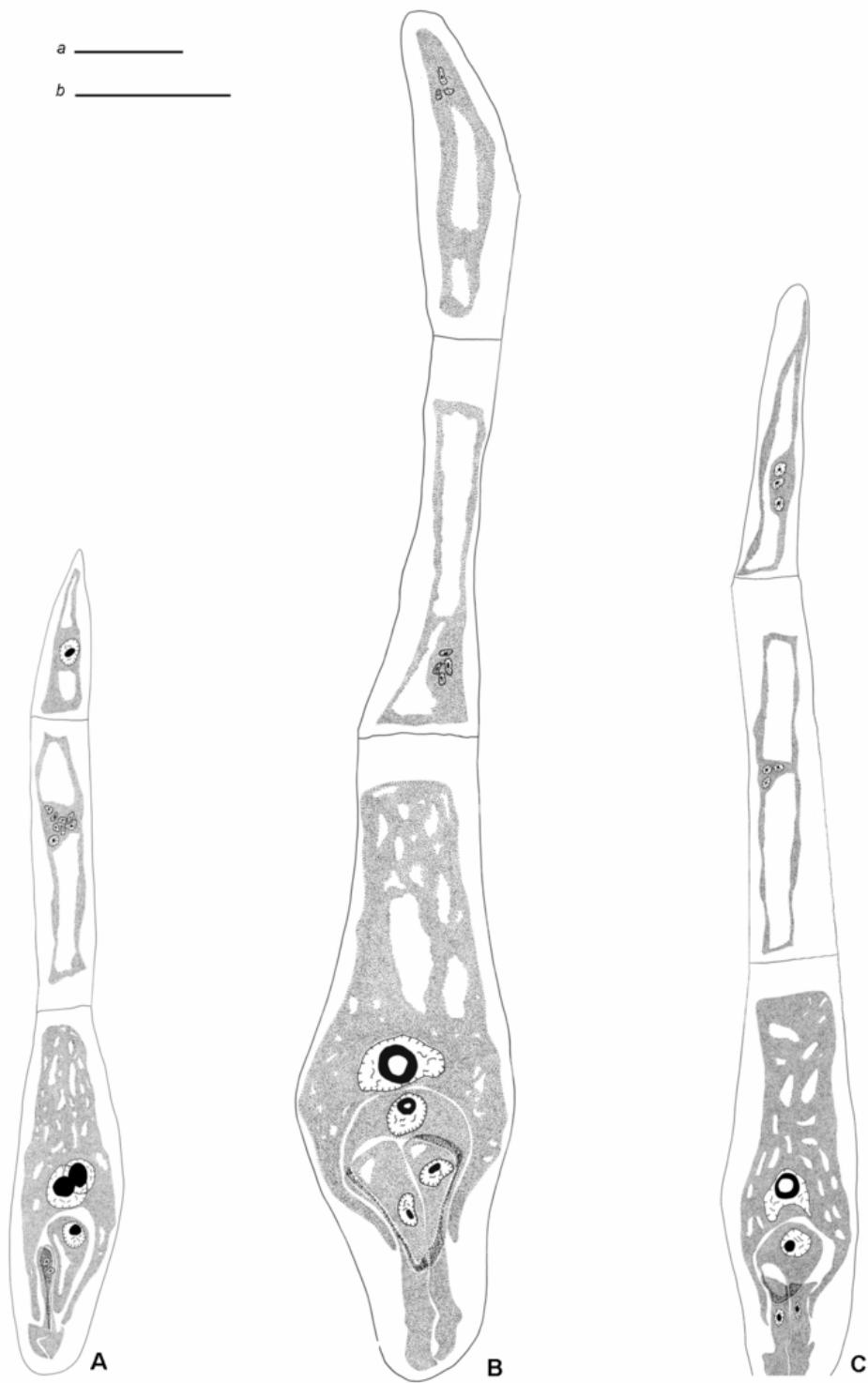


Figura 8. T5. **A)** Gametófito femenino maduro, sinérgidas delgadas, célula media los núcleos polares no fusionados, dos antípodas con paredes rotundas. **B)** Gametófito femenino maduro, sinérgidas con vacuolas y núcleos calazales, citoplasma de la célula media y de la oosfera en contacto, dos antípodas con pequeños núcleos y paredes gruesas. **C)** Megagametófito maduro largo con dos antípodas muy vacuolizadas y paredes gruesas. *Barras:* 50 μm ; **A, C:** barra *a*; **B:** barra *b*.

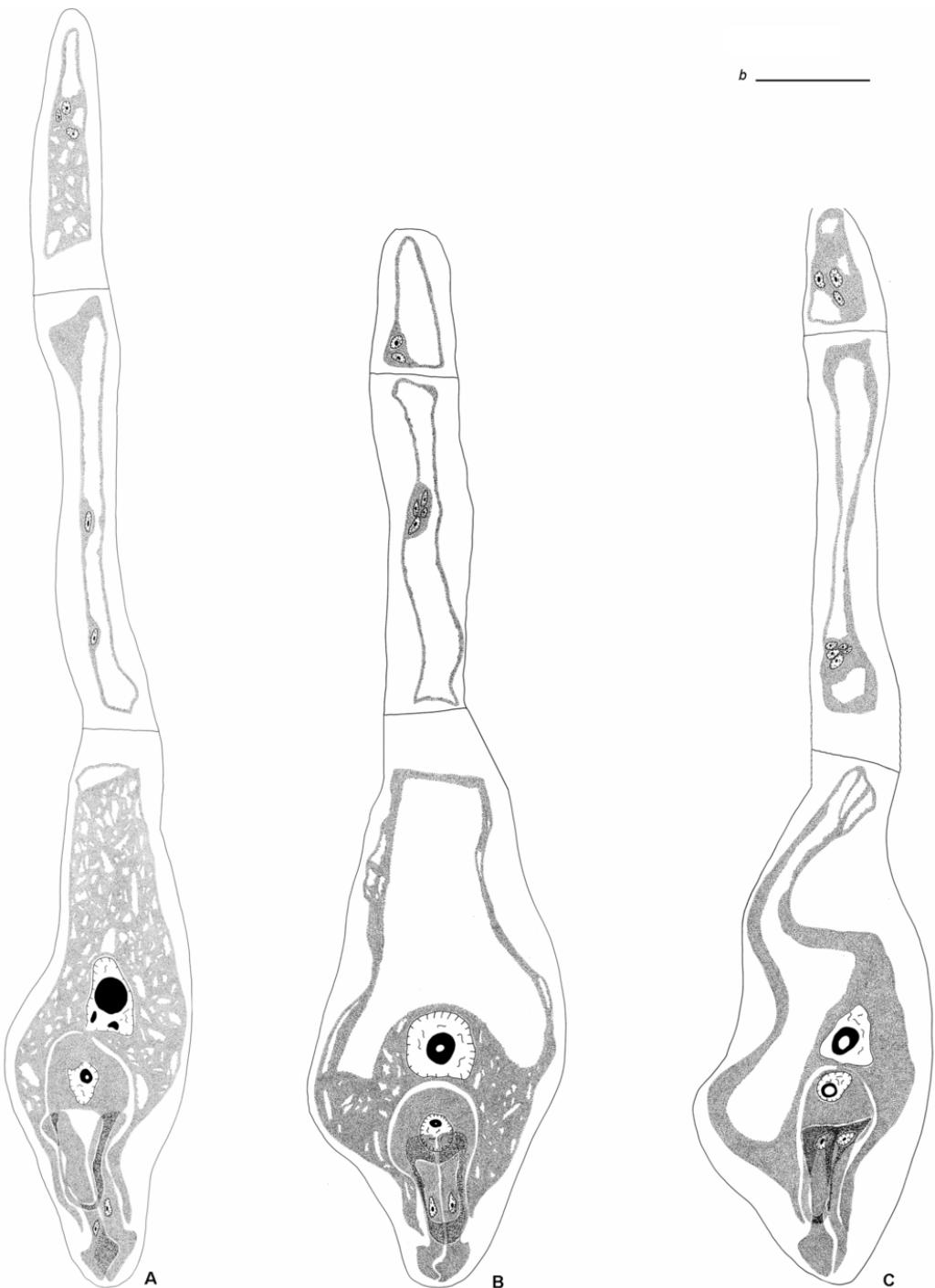


Figura 9. T5. **A)** Gametófito femenino maduro largo, sinérgidas con núcleos pequeños, oosfera con una vacuola micropilar y núcleo calazal, célula media con varias vacuolas pequeñas y un núcleo conspicuo con tres nucleolos, dos antípodas, la micropilar muy grande, con una gran vacuola y paredes gruesas. **B)** Gametófito maduro, célula media más ancha y muy vacuolizada, con núcleo conspicuo, dos antípodas vacuolizadas con paredes gruesas. **C)** Megagametófito, citoplasma de la célula media en contacto con la oosfera y más delgado en el extremo calazal con una vacuola muy desarrollada. *Barra: 50 µm*

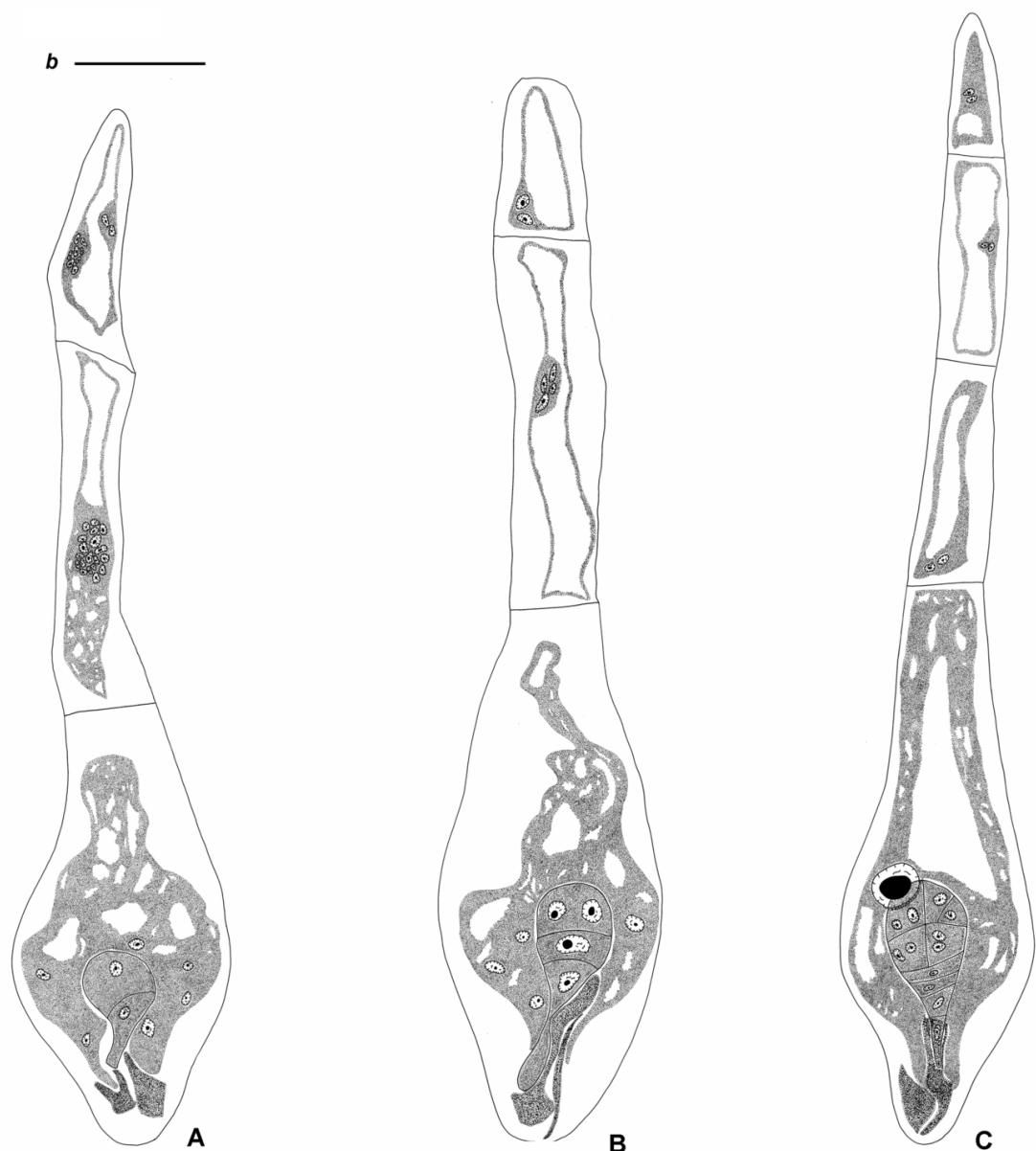


Figura 10. T5. **A)** Megagametófito fertilizado, sinérgidas degradadas, embrión tricelular, endosperma nuclear, dos antípodas multinucleadas con paredes gruesas y sin signos de degradación. **B)** Gametófito fertilizado, una sinérgida muy degradada y la otra comenzando a degenerar, embrión tetracelular, endosperma nuclear, dos antípodas con paredes rotundas. **C)** Embrión globular, sinérgidas degradadas, núcleo endospermogenético son dividirse, tres antípodas con paredes gruesas. *Barra: 50 µm*

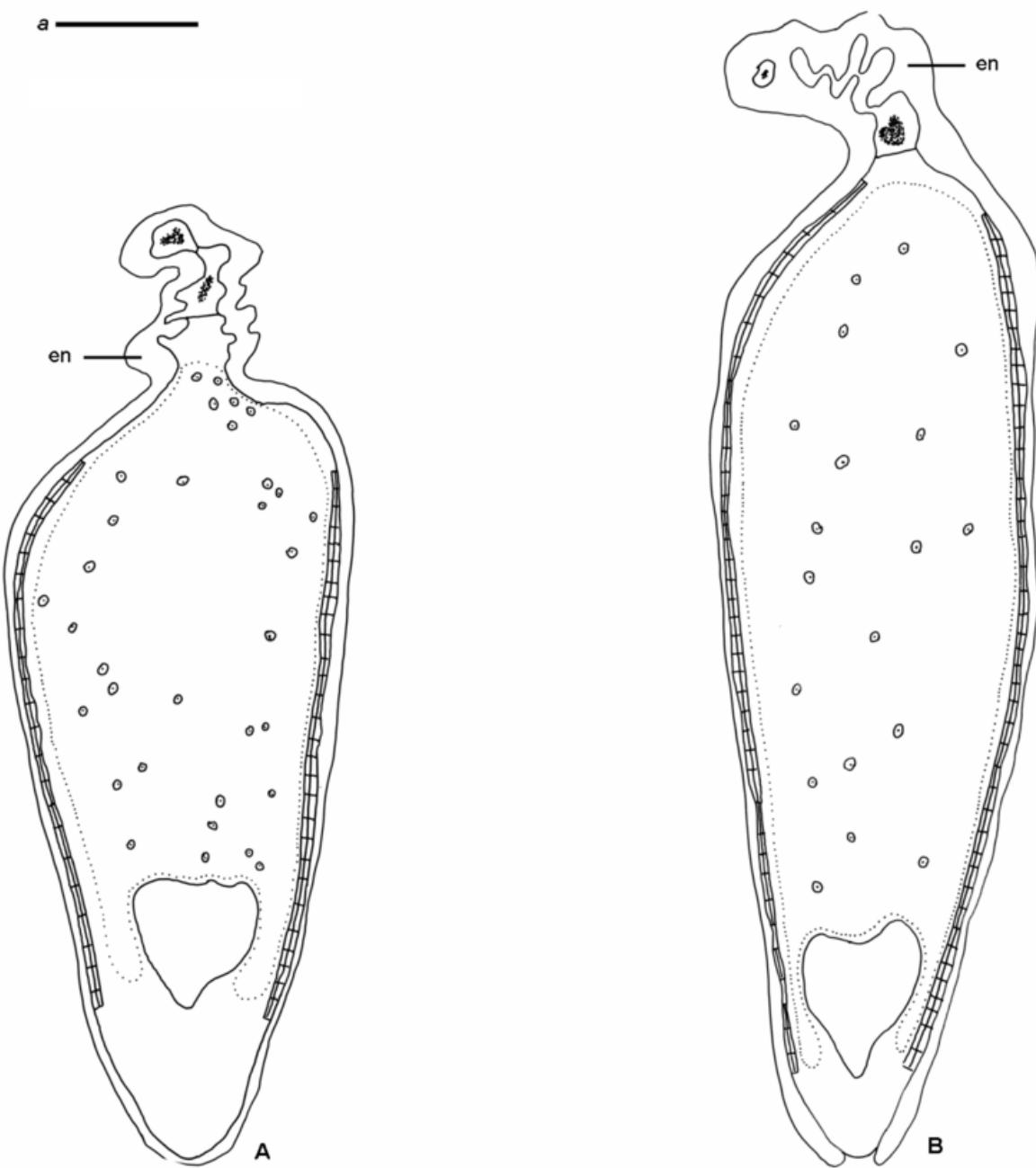


Figura 11. T5. **A)** Aspecto general del megagametófito en el estadio de embrión cordiforme, comienzo de la celularización de parte del endosperma, el endotelio (en) aumenta el número de capas celulares y comprime al gametófito a la altura de las paredes gruesas de las antípodas, aislando las. **B)** Aspecto general del gametófito en el estadio de embrión cordiforme, antípodas prácticamente consumidas. *Barra: 50 µm.*

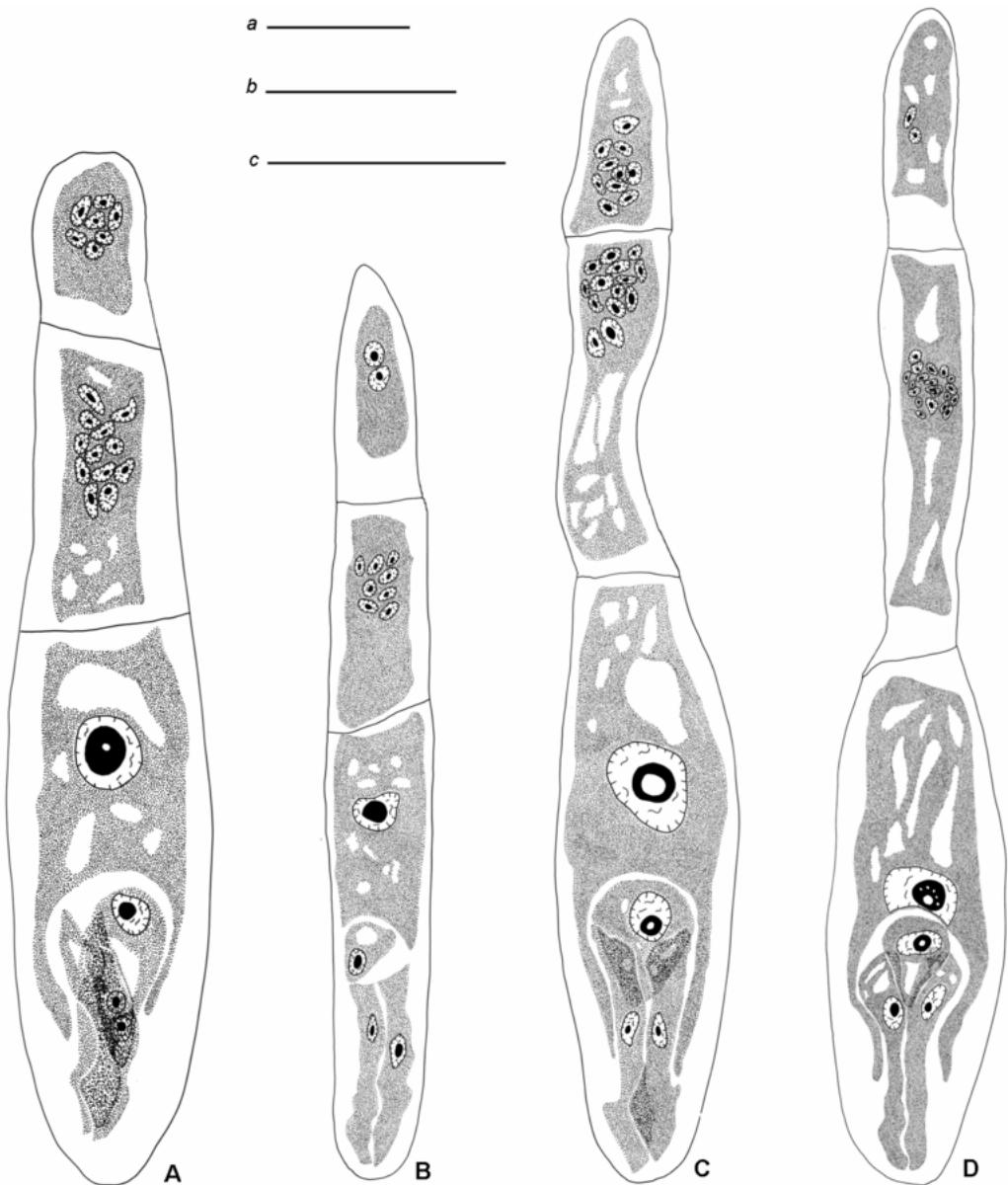


Figura 12. T6. **A)** Megagametófito, célula media con escasas vacuolas y un núcleo conspicuo en el centro, dos antípodas multinucleadas con paredes gruesas. **B)** Gametófito femenino joven, sinérgidas con núcleos medios a calazales, oosfera pequeña, célula media con algunas vacuolas y el núcleo en el centro, dos antípodas con paredes gruesas. **C)** Gametófito femenino, sinérgidas con núcleos medios, oosfera con escasas vacuolas pequeñas y un núcleo conspicuo con una vacuola nucleolar, célula media rodeando a la oosfera y al extremo calazal de las sinérgidas, dos antípodas multinucleadas con paredes gruesas. **D)** Gametófito maduro, sinérgidas elongadas hacia la micrópila y más anchas en el extremo calazal, con vacuolas y núcleos calazales, oosfera pequeña con una vacuola micropilar, célula media rodeando a la oosfera con un núcleo conspicuo y varias vacuolas nucleolares, dos antípodas multinucleadas. *Barras:* 50 μ m; **A:** barra *c*; **B, C:** barra *b*, **D:** barra *a*.



Figura 13. T6. **A)** Megagametófito maduro con sinérgidas degradándose y una oosfera pequeña, célula media muy vacuolizada, dos antípodas con paredes gruesas. **B)** Megagametófito maduro, oosfera elongada hacia la micropila con citoplasma denso, célula media de gran tamaño que se extiende por detrás del aparato oosférico, con citoplasma denso, poco vacuolizado y núcleo conspicuo. **C)** Gametófito femenino maduro, oosfera elongada hacia el extremo micropilar, célula media larga con una vacuola grande y un núcleo conspicuo con dos nucleolos, uno de ellos con numerosas vacuolas pequeñas, dos antípodas. *Barra: 50 µm*

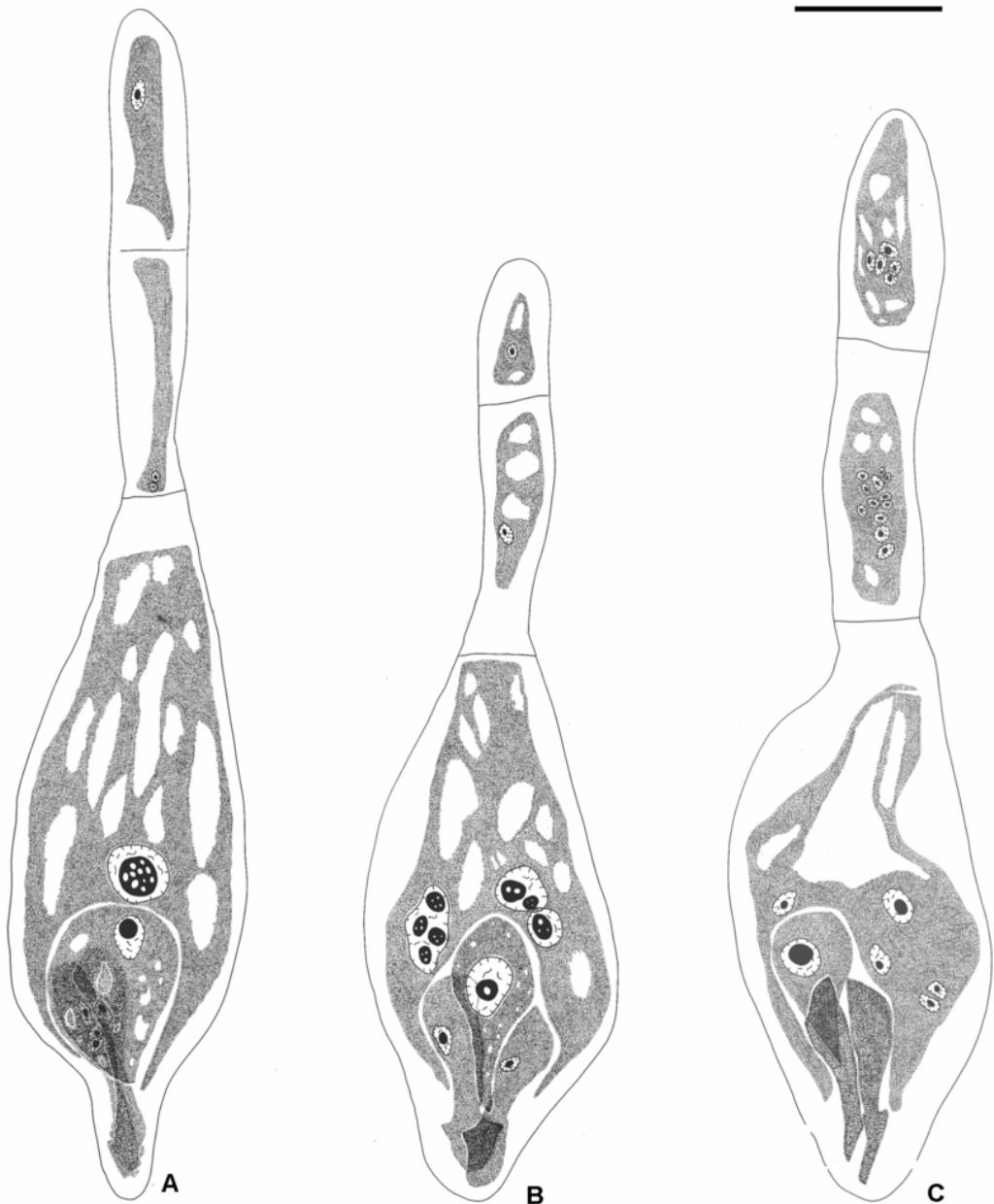


Figura 14. T6. **A)** Megagametófito fertilizado, ambas sinérgidas con sus núcleos, núcleos gaméticos en una de ellas, célula media vacuolizada con un núcleo conspicuo y algunas vacuolas nucleolares, dos antípodas con citoplasma denso y paredes gruesas. **B)** Gametófito femenino, sinérgidas grandes, oosfera con núcleo conspicuo y pequeñas vacuolas, célula media con tres núcleos con numerosos nucleolos y vacuolas nucleolares, dos antípodas mononucleadas con paredes gruesas. **C)** Gametófito fertilizado, sinérgidas degradando, cigoto, endosperma nuclear, dos antípodas con paredes gruesas. *Barra: 50 µm*



Figura 15. T7. **A)** Megagametófito maduro, sinérgidas grandes, oosfera elongada hacia el extremo micropilar con pequeñas vacuolas, dos antípodas con paredes gruesas. **B)** Gametófito maduro, sinérgidas elongadas hacia la micrópila con núcleos pequeños, oosfera pequeña, célula media con núcleo conspicuo, dos antípodas con paredes gruesas. **C)** Gametófito grande, sinérgidas cortas, oosfera grande, célula media con numerosas vacuolas y un núcleo conspicuo con dos nucleolos, uno con una gran vacuola, dos antípodas con paredes gruesas. *Barra: 50 µm*

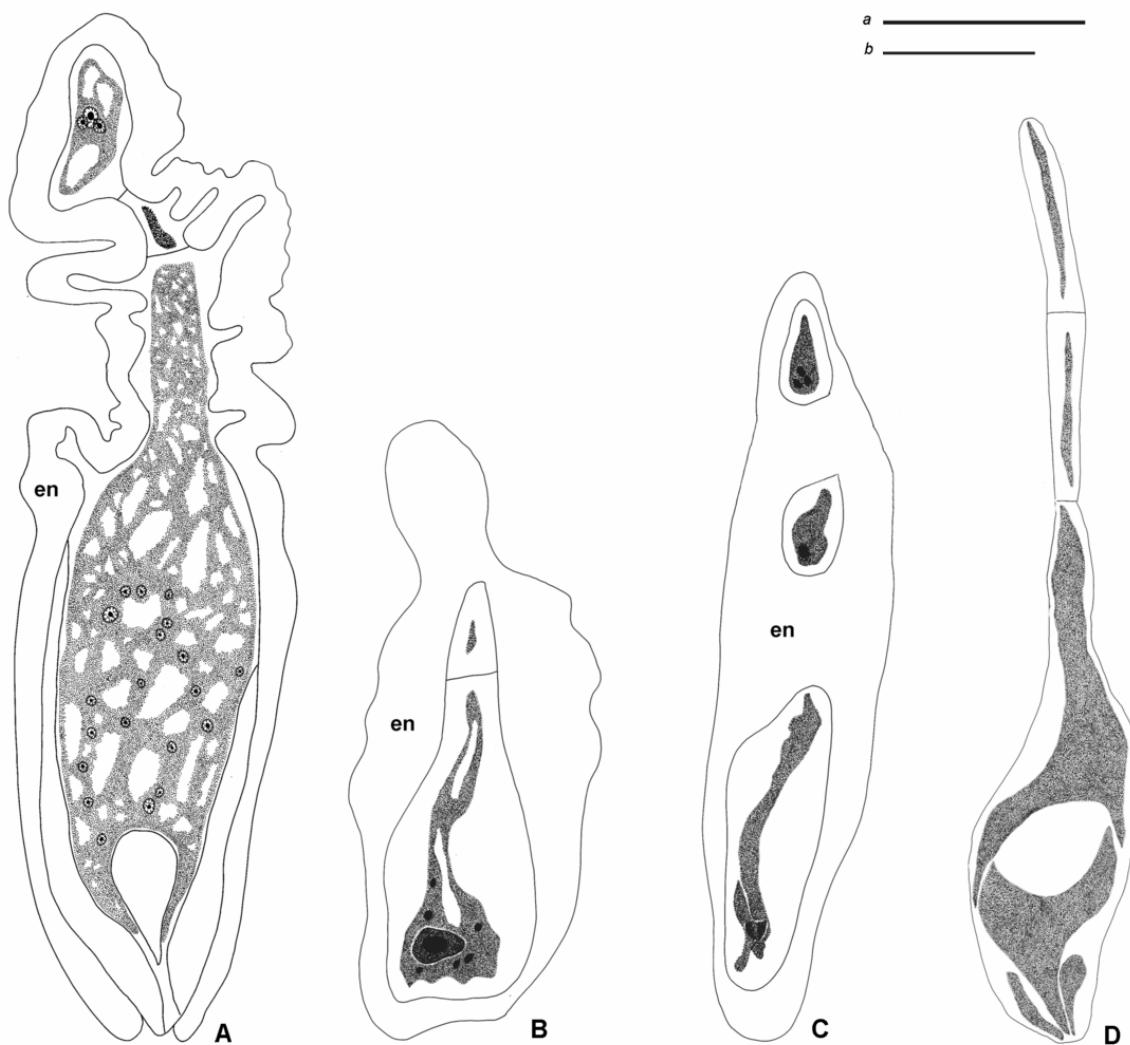


Figura 16. T7. **A)** Aspecto general del megagametófito en el estadio de embrión globular, suspensor prolongado hacia la micropila, endosperma nuclear con cierto grado de celularización, endotelio con más capas de células. **B)** Gametófito femenino abortando, probablemente después de la fertilización. **C)** Megagametófito abortado, restos de sinérgidas, de un embrión aparentemente cordiforme, del endosperma y de las antípodas. **D)** Megagametófito degradado, probablemente no fertilizado. *Barras: 50 µm; A, B, D: barra a; C: barra b.*

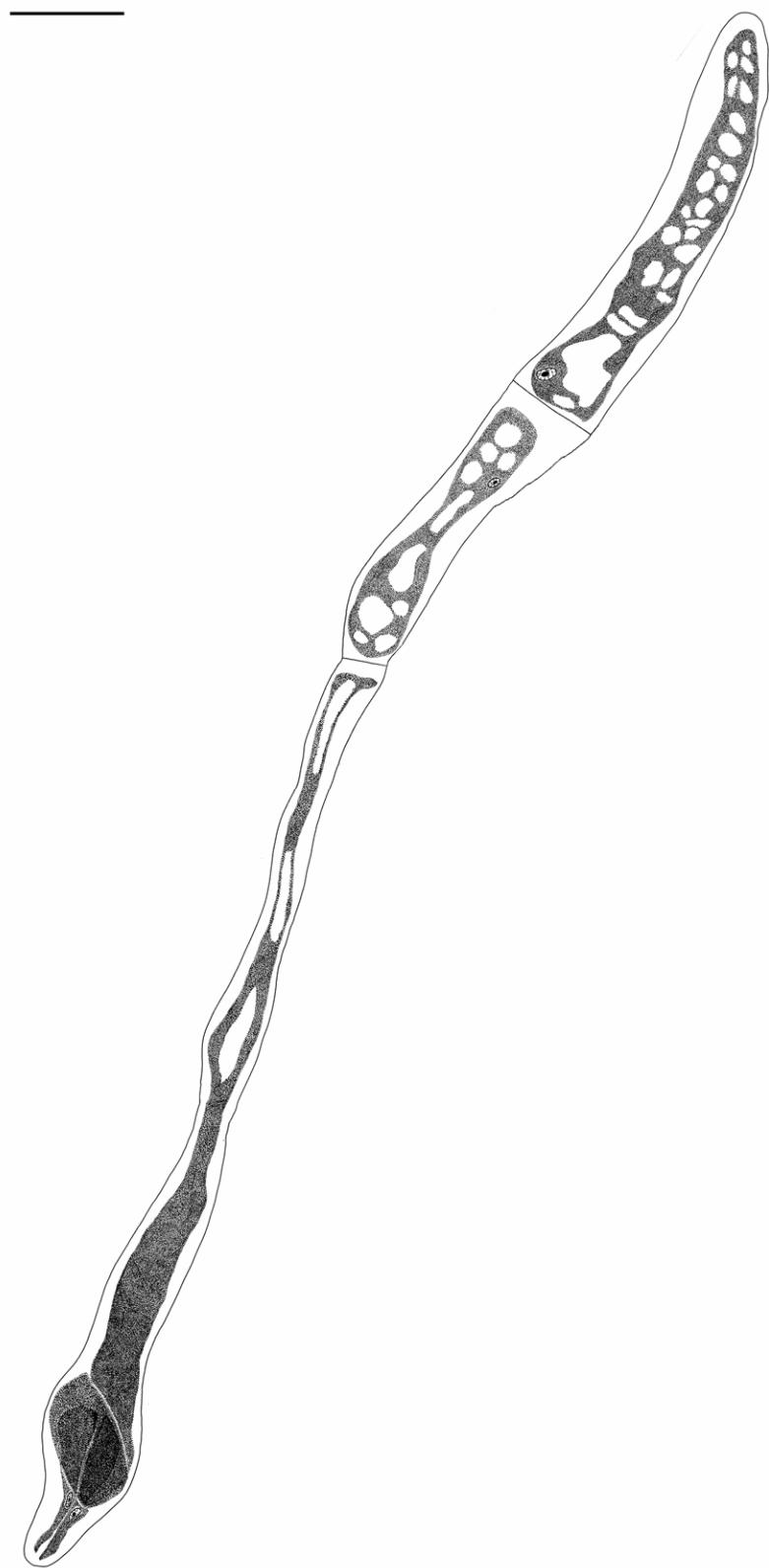


Figura 17. T8. Megagametófito no fertilizado abortando, sinérgidas con sus núcleos, célula media muy larga, antípodas uninucleadas muy vacuolizadas. *Barra: 50 µm*

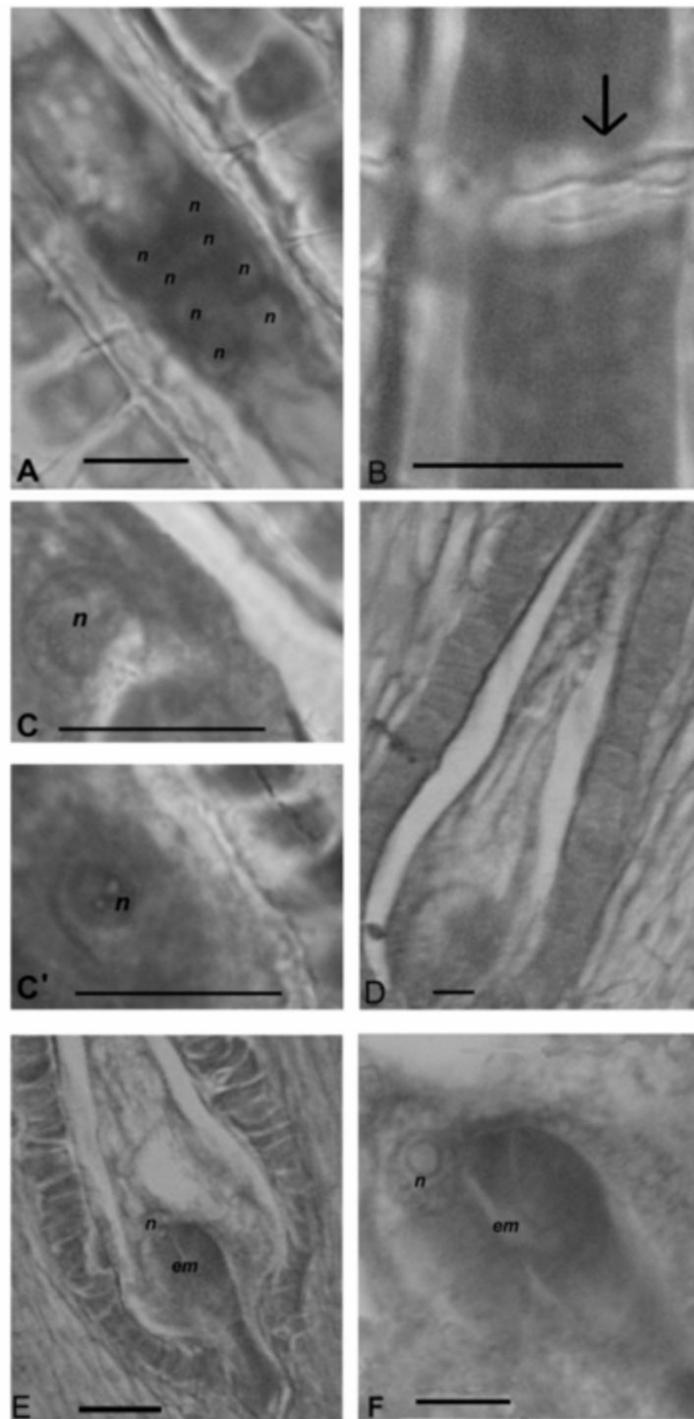


Figura 18. Fotos M.O. **A)** Antípoda multinucleada (*n*). **B)** Detalle de la pared gruesa entre dos antípodas (*flecha*). **C, C'** T5. Núcleos polares sin fusionarse en megagametófito maduro. **C)** Uno de los núcleos polares (*n*). **C')** El otro núcleo polar (*n*) en diferente plano. **D)** T6. Célula media de gran tamaño de un megagmetofito aparentemente no funcional. **E)** T5. Núcleo endospermogenético (*n*) sin dividirse en estadio de embrión globular (*em*). **F)** T5. Detalle de E. *Barras: 25 μm*

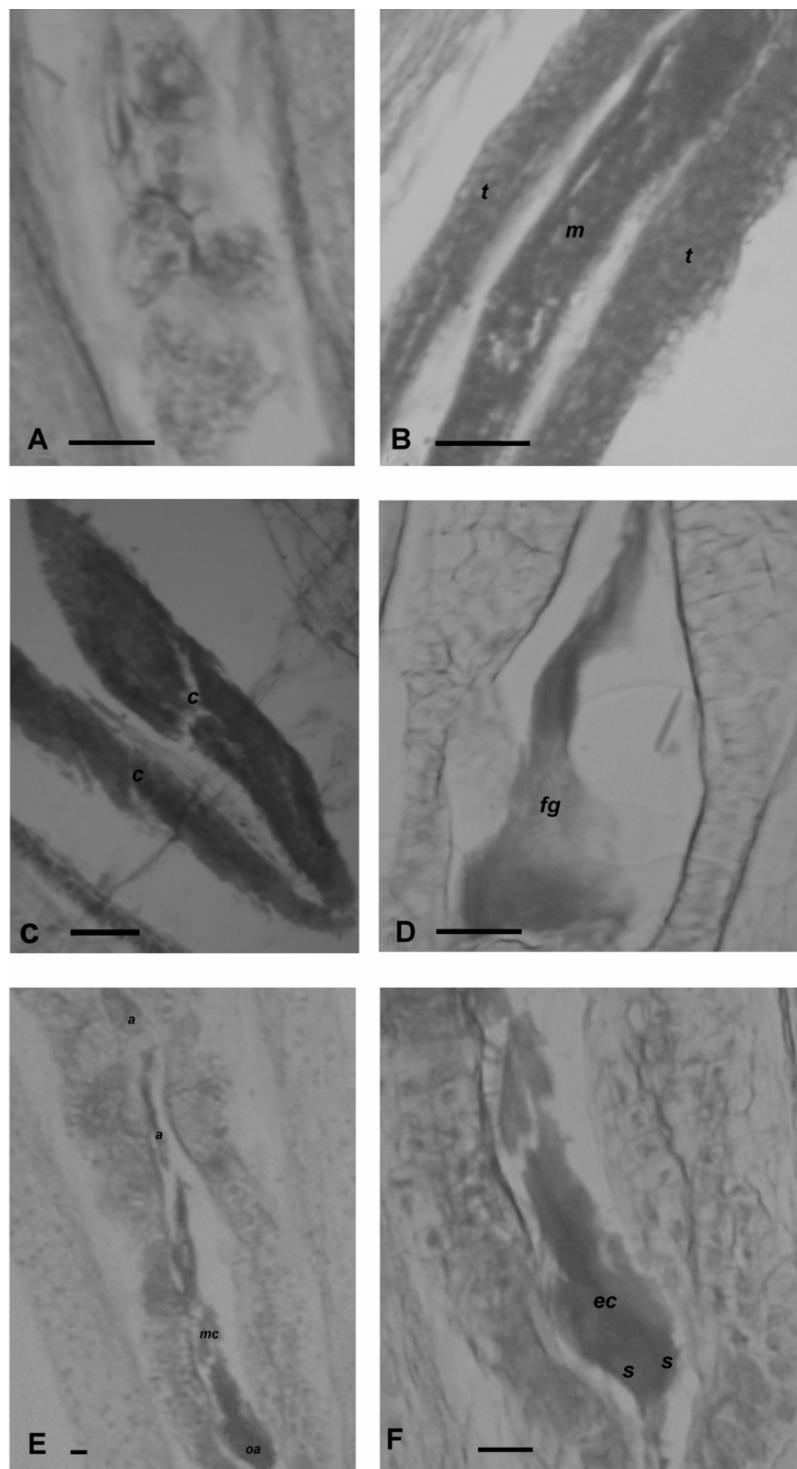


Figura 19. Fotos M.O. **A)** T7. Celulas proliferadas del endotelio en un gametófito abortando. **B)** T7. Megagametófito (*m*) y tegumentos del óvulo (*t*) abortando. **C)** T8. Detalle de los cotiledones (*c*) de un embrión maduro abortivo. **D)** T7. Gametófito femenino (*fg*) abortando, probablemente después de la fertilización. **E)** T8. Megagametófito no fertilizado abortando, aparato oosferico (*oa*), célula media (*mc*) muy larga, antípodas (*a*). **F)** T8. Detalle de la oosfera (*ec*) y de las sinérgidas (*s*). *Barras A-D: 25 µm, E, F: 50 µm.*

CAPITULO IX

Discusión general



El presente trabajo contiene aportes originales al conocimiento de la embriología del girasol (*Helianthus annuus*) y contribuye indirectamente a la comprensión embriológica de la familia Asteraceae en general. Se resumen los principales estadios de desarrollo en relación al tamaño de la flor y su posición en el capítulo (Figs. 1-5). Muchos de los aspectos del desarrollo de los gametófitos y de los eventos post-fertilización del girasol permanecían mal comprendidos y la literatura previa mostraba contradicciones. El estudio aquí realizado, en donde se compararon cuatro genotipos, sugiere que esas inconsistencias se deben a que los distintos autores trabajaron con genotipos diferentes, con lo cual cada uno tuvo acceso parcial a la diversidad embriológica que presenta la especie.

Entre los aportes más importantes al conocimiento embriológico de Asteraceae cabe destacar la detección de una membrana peritapetal con cuerpos de Ubisch u orbículas en su superficie interna, la cual envuelve a los granos de polen maduros. Esto concuerda con las observaciones de Heslop-Harrison (1969) quien halló dicha membrana en otros miembros de la familia: *Cosmos bipinnatus* (Heliantheae), *Ambrosia artemisiifolia* (Ambrosieae) y *Tagetes patula* (Helenieae), aunque sin mencionar la presencia de orbículas. La presencia de cuerpos de Ubisch en una especie con tapete plasmodial como *Helianthus annuus* contradice la visión de muchos autores que consideran que las orbículas son exclusivas de los tapetes secretores (Raghavan, 1997; Huysmans y El-Ghazaly, 1998; Furness y Rudall, 2001) y coincide con lo observado en representantes de la familia Malvaceae con igual tipo de tapete por Strittmatter *et al.* (2000) y Galati *et al.* (2007). Sin embargo, este es el primer reporte sobre la presencia de orbículas asociadas a un tapete de tipo plasmodial en la familia Asteraceae.

La búsqueda de causas embriológicas a la disminución del rendimiento del girasol por aborto de frutos se efectuó a lo largo de esta tesis a través de tres caminos. Por un lado, se caracterizó exhaustivamente el desarrollo embriológico de la especie en plantas que crecían en condiciones óptimas de cultivo, y sobre una base genotípica amplia. Esto proveyó un patrón de referencia amplio con el cual fue posible comparar los desarrollos embriológicos asociados a situaciones de aborto de frutos (Capítulos III a VII).

Por otro lado, se llevó a cabo un experimento controlado que se esperaba generara alteraciones embriológicas asociables al aborto de frutos. El experimento consistió en la aplicación de pulsos de estrés hídrico en diferentes momentos de la ontogenia de la inflorescencia, y efectivamente permitió identificar fases del desarrollo embriológico en las que la sequía altera el curso normal de los acontecimientos y genera megagametófitos inviables, lo que acarrea aborto de frutos. En la misma línea estratégica, se analizó el desarrollo embriológico frente a varias condiciones de polinización, lo que permitió identificar un caso en que la autopolinización producía una alta tasa de alteraciones, también asociables a aborto de frutos (Capítulo VIII).

El análisis de frutos maduros con anormalidades en el embrión permitió caracterizar anatómicamente el resultado final de algunos de los procesos embriológicos anormales (Capítulo VII).

No se puede adjudicar el aborto de los frutos a anormalidades durante el desarrollo del saco embrionario, ya que no hay indicios de que los megagametófitos de

flores que se han desarrollado bajo condiciones ambientales óptimas, no puedan ser normalmente fecundados para formar semillas. Los estudios que incluyeron estrés hídrico, que generaron nuevas variantes en la configuración del megagametófito, permitieron concluir que sólo se puede formar un embrión viable por fertilización de megagametófitos que poseen sólo dos antípodas multinucleadas, las que además poseen paredes rotundas entre ellas y en el límite con la célula media.

Se comprobó que ante la falta de una polinización eficaz los frutos se desarrollan por partenocaricia y por lo tanto no hay embrión en su interior.

El híbrido P 30 es el que presenta menor rendimiento al formar embriones que no desarrollan bien sus cotiledones y finalmente abortan.

Los resultados obtenidos como respuesta al estrés hídrico son de interés económico, ya que pueden contribuir a tomar decisiones relacionadas con la economía de agua del cultivo. Si la falta de agua se produce durante los primeros estadios del desarrollo floral del girasol se estima que no habrá una diferencia sustancial en la merma de los frutos. Sin embargo, si el cultivo se encuentra en los últimos estadios ontogenéticos de las flores y los frutos, el rendimiento disminuye notablemente. Estudios previos habían ya demostrado que cuanto más tarde en la maduración de los capítulos es aplicado el estrés, mayores son las pérdidas en la producción de granos. Sin embargo, no se habían determinado las causas ni precisado con exactitud los estadios del desarrollo más afectados (Stegman y Lemert, 1981, Hall *et al.*, 1989; Whitfield *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1990; Plaut, 1995; Marin *et al.*, 2000; Chimenti *et al.*, 2002). Los

resultados expuestos en este trabajo sugieren fuertemente que al menos parte de estas pérdidas en el rendimiento son consecuencia de anomalías embriológicas causadas por el estrés hídrico. De todos modos, serían necesarios estudios cuantitativos para establecer inequívocamente cuánto de la pérdida total se debe a causas embriológicas.

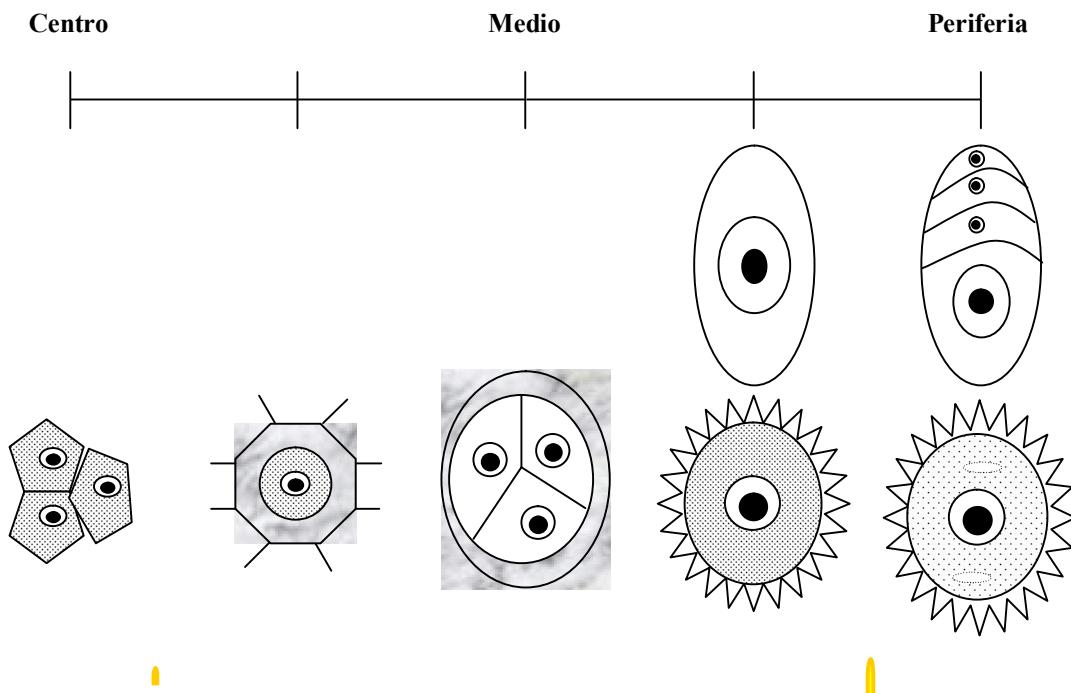


Figura 1. Estadio de desarrollo ontogenético de la flor de acuerdo a su posición aproximada en el capítulo. En la primera fila se observan los estadios de la megasporoénesis, en la segunda los de la microsporogénesis y microgametogénesis y en amarillo el tamaño real de la flor.

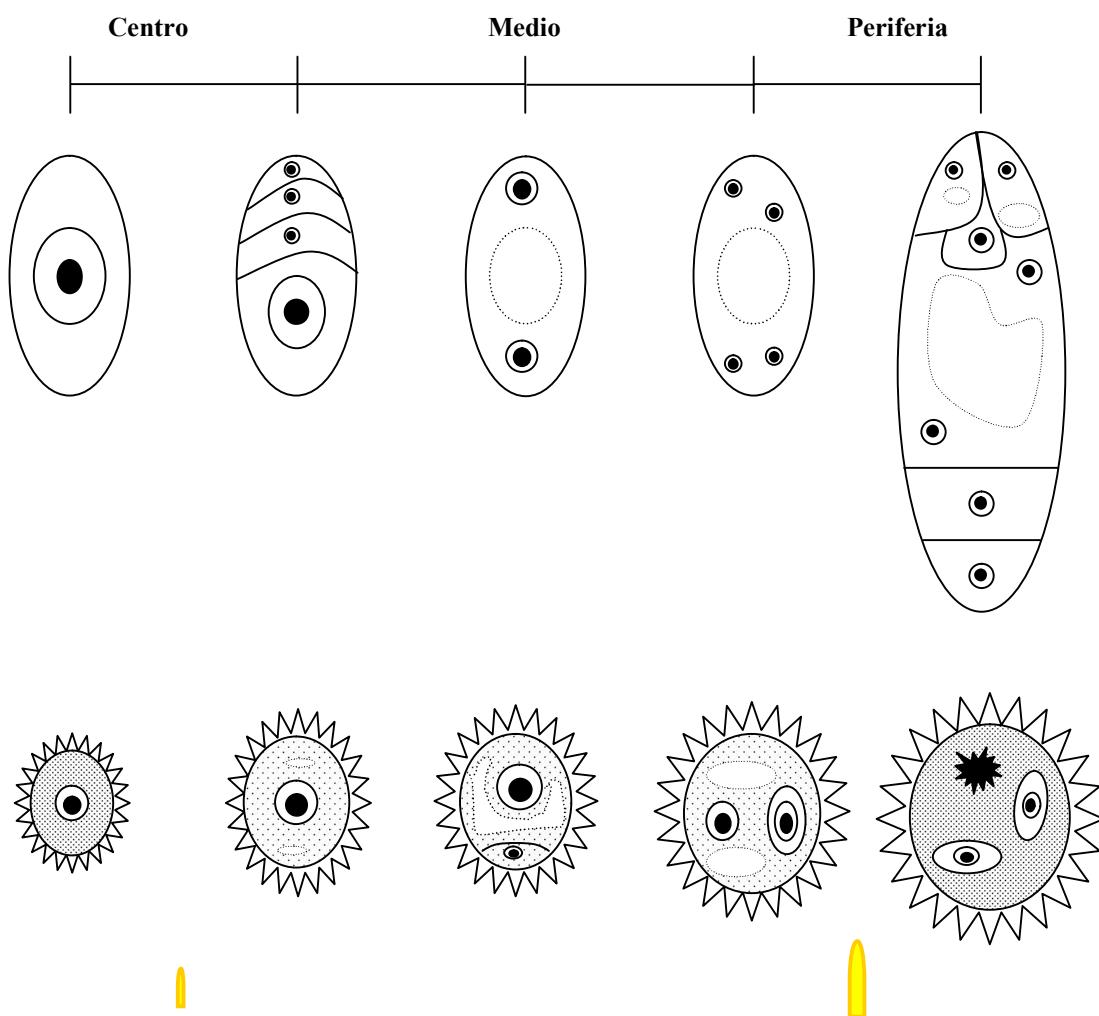


Figura 2. Estadio de desarrollo ontogenético de la flor de acuerdo a su posición aproximada en el capítulo. En la primera fila se observan los estadios de la megasporoénesis y megagametogénesis, en la segunda los de la microgametogénesis y en amarillo el tamaño real de la flor.

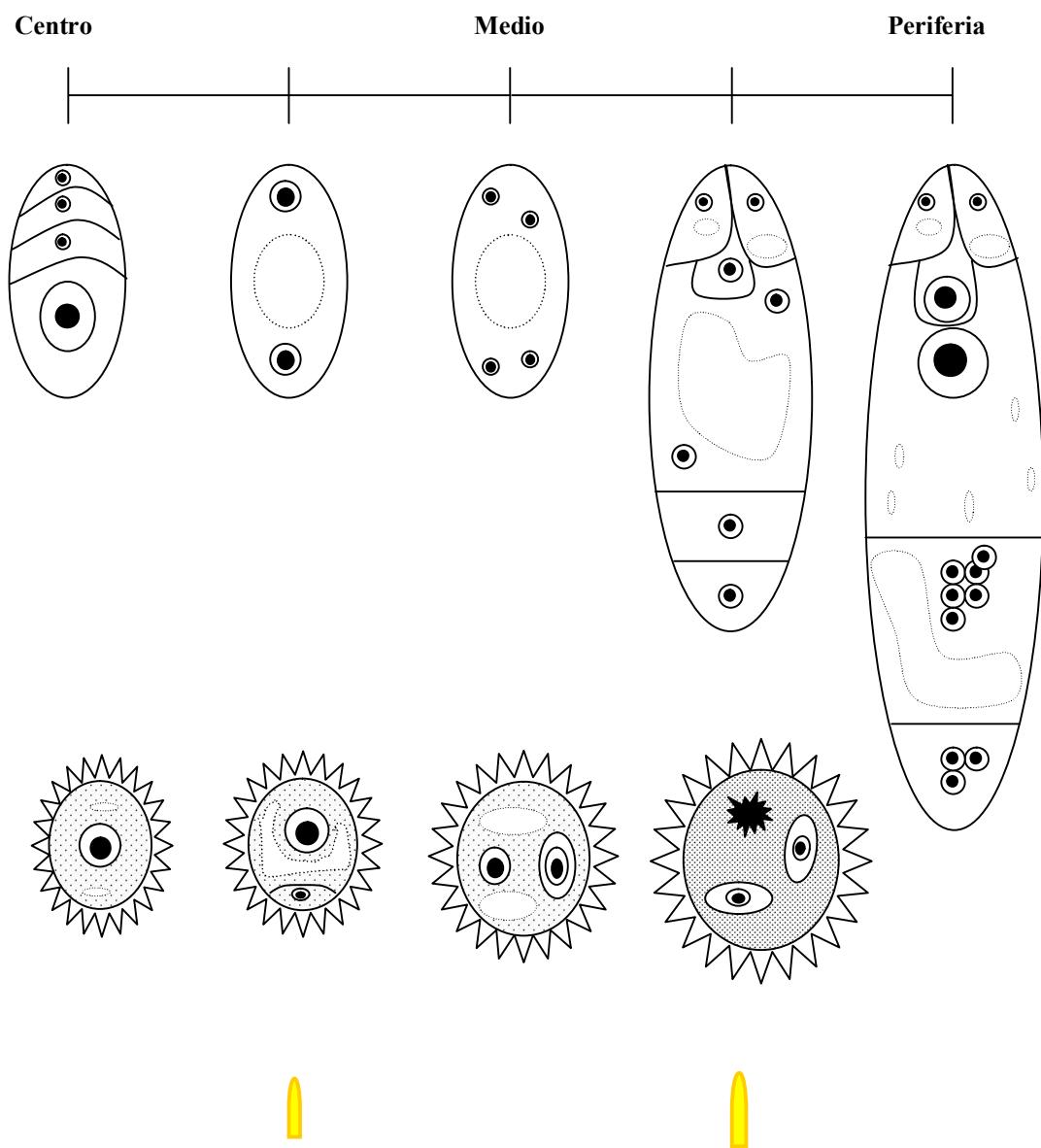


Figura 3. Estadio de desarrollo ontogenético de la flor de acuerdo a su posición aproximada en el capítulo. En la primera fila se observan los estadios de la megagametogénesis, en la segunda los de la microgametogénesis y en amarillo el tamaño real de la flor

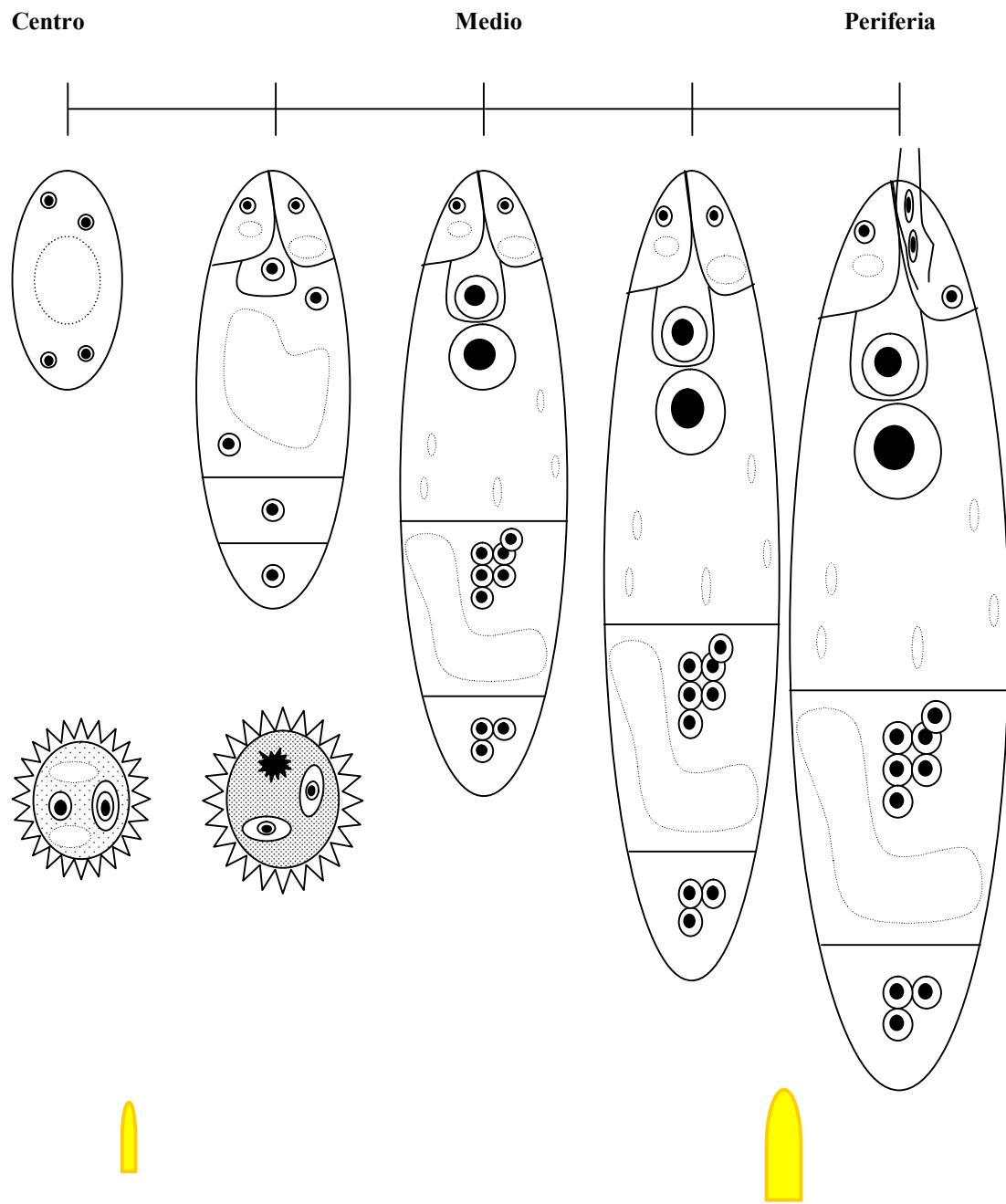


Figura 4. Estadio de desarrollo ontogenético de la flor de acuerdo a su posición aproximada en el capítulo. En la primera fila se observan los estadios de la megagametogénesis, en la segunda el desarrollo del grano de polen y en amarillo el tamaño real de la flor.

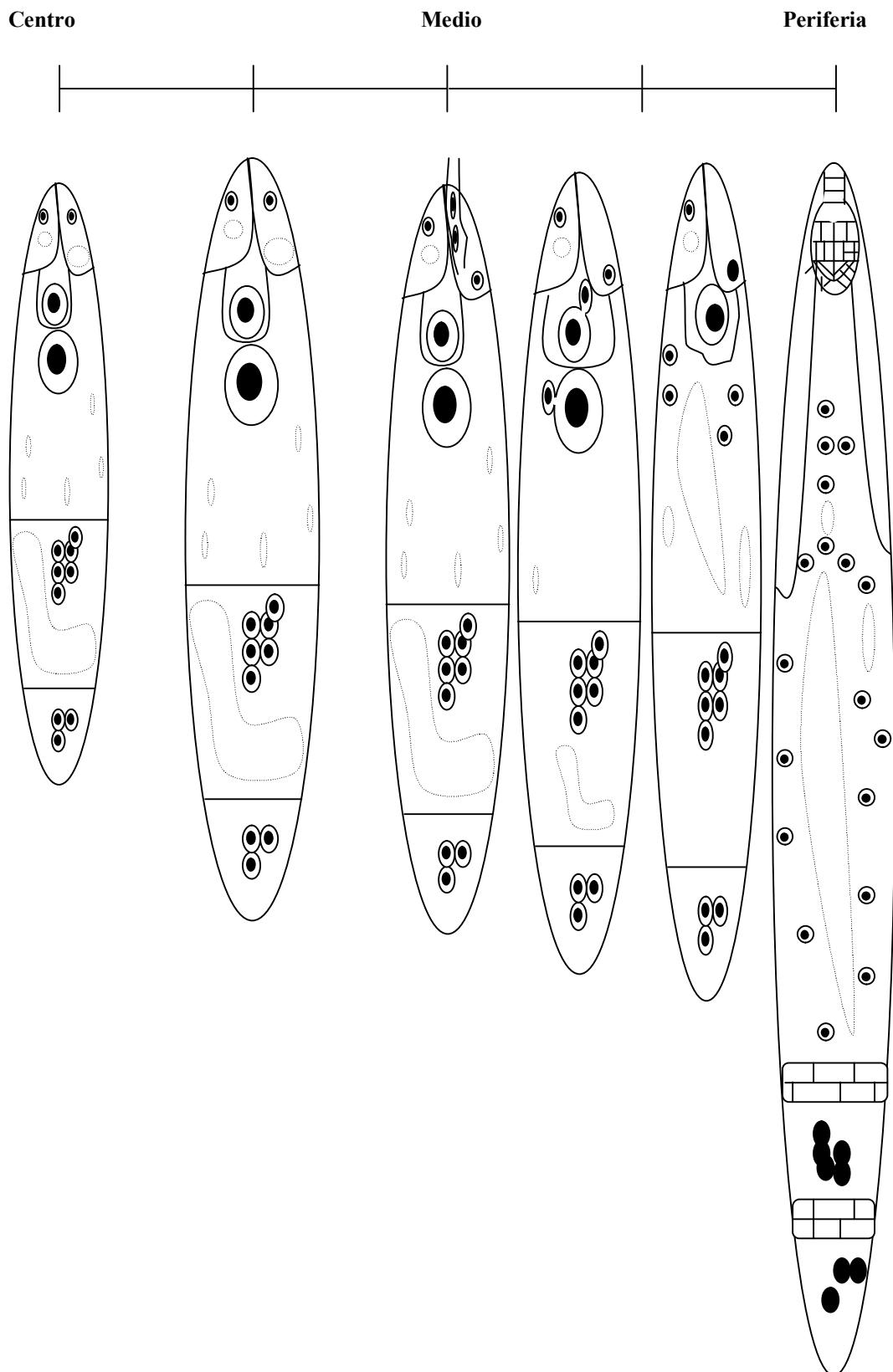


Figura 5. Estadio de desarrollo del megagametófito y del embrión de acuerdo a su posición aproximada en el capítulo.

CAPITULO X

Referencias



Al-Kaisi, M. M., Broner, I. 1992. Crop Water Use and Growth Stages. Colorado State University Cooperative Extension Crop. Series Irrigation No. 4715. Colorado State University, Fort Collins. CO.

Aguirrezábal, L. A. N., F. Tardieu. 1996. An architectural analysis of the elongation of field-grown sunflower root systems. Elements for modelling the effects of temperature and intercepted radiation. *Journal of Experimental Botany* **47**: 296, 411-420.

Bell, J., Hicks, G. 1976. Transmitting tissue of the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. *Planta* **131**: 187-200.

Bhatnagar, S. P., Sawhney, V. 1981. Endosperm- its morphology, ultrastructure, and histochemistry. *Int. Rev. Cytol.* **73**: 55-102.

Brink, R. A., Cooper, D. C. 1947. The endosperm in seed development. *Bot Rev.* **13**: 423 – 541.

Bremner, P. M., Preston, G. K. 1990. A field comparison of sunflower (*Helianthus annuus*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) in a long drying circle: II – Plant water

relations, growth and yield. *Aust J Agric Res* **41**: 463–478.

Bremner, P. M., Preston, G. K., Groth, C. F. de St. 1966. A field comparison of sunflower (*Helianthus annuus*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) in a long drying cycle.

I. Water extraction. *Australian Journal of Agricultural Research* **37(5)**: 483 - 493

Bystedt, P. A. 1990. The transmitting tract in *Timezia fosteriana* (Iridaceae). I. Ultrastructure in the stigma, style and ovary. *Nord. J. Bot.* **9**:507-518.

Cabrera, A. L. 1963. Flora de la Provincia de Buenos Aires, Parte VI: Compuestas. Colección Científica del INTA, Buenos Aires.

Cabrera, A. L. 1974. Compositae En: Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Parte VI. Colección Científica del INTA, Buenos Aires

Carano, E. 1921. Nuove ricerche sulla embriologia delle Asteraceae. *Ann. Bot.* (Rome) **15**: 97-196.

Cantagallo, J. E., Chimenti, C. A., Hall, A. J. 1997. Number of seeds per unit area in

sunflower correlates well with a photothermal quotient. *Crop Sci.* **37**: 1780-1786.

Cantagallo, J. E., Medan, D., Hall, A. J. 2004. Grain number in sunflower as affected by shading during floret growth, anthesis and grain setting. *Field Crops Res.* **85**: 191-202.

Carelli, M. L. C., Ungaro, M. R. G., Fahl, J. I., Novo, M. do C. de S. S. 1996. Nitrogen levels, metabolism, growth and yield of sunflowers. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **8**: 2, 123-130.

Chimenti, C. A., Pearson, J., Hall, A. J. 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crop Research* **75**: 235-246.

Ciampolini, F., Cresti, M., Kapil, R. N. 1983. Fine structural and cytochemical characteristics of style and stigma in olive. *Caryologia* **36**: 211-230.

Clarke, A. E., Considine, J. A., Ward, R., Knox, R. B. 1977. Mechanism of pollination in *Gladiolus*: roles of the stigma and pollen- tube guide. *Ann. Bot.* **41**: 15-20.

Clarke, A. E., Abbot, A., Mandel, T. E., Pettitt, J. M. 1980. Organization of the wall

layers of *Gladiolus gandavensis*: a freeze-fracture study. *J. Ultrastr. Res.* **73**: 269-281.

Clutter, M., Brady, T., Sussex, M, Walbot, V. 1972. Rates of RNA and DNA synthesis in embryos and suspensors of *Phaseolus coccineus*. *Am. J. Bot.* **59**: 648-649.

Cocucci, A. E. 1981. Fertilización en orquídeas. *Anal. Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Nat. Buenos Aires* **33**: 75-92.

Connors, D. J., Sadras, V. O. 1992. Physiology of yield expression in sunflower. *Field Crops Res.* **30**:333-389.

Covas, G. 1966. Antófitas nuevas para la flora pampeana. *Apuntes para la flora de La Pampa* **22**: 88.

Cresti, M., Ciampolini, F., Tiezzi, A. 1986. Ultrastructural studies on *Nicotiana tabacum* pollen tubes grown in different culture medium (preliminar results). *Acta Bot. Neerl.* **35**: 285-292.

Cresti, M., van Went, J. L., Pacini, E., Willemse, M. T. M. 1976. Ultrastructure of

transmitting tissue of *Lycopersicum peruvianum* style: development and histochemistry.

Planta **132**: 305-312.

Dahlgren, K. V. O. 1920. Zur embryologie der Kompositen mit besonder berücksichtigung der Endospermibildung. *Z. Bot.* **12**: 481-516

----- 1923. Notes on the ab initio cellular endosperm. *Bot notis.*
pp.1-24.

Davis, G. L. 1961. The occurrence of synergid haustoria in *Cotula australis* (Less.)
Hook. f. (Compositae). *Aust. J. Sci.* **24**: 296.

----- 1962. Embryological studies in the Compositae. II: Sporogenesis,
gametogenesis and embryogenesis in *Ammobium alatum* R. Br. *Aust. J. Bot.* **10**: 65-75.

----- 1966. Systematic embryology of the angiosperms. John Wiley and Sons:
New York.

D'Ambrogio, A. 1986: Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur S.A.

Buenos Aires, Argentina.

Dardanelli, J. L., Bachmeier, O. A., Sereno, R., Gil, R. 1997. Rooting depth and soil water extraction patterns of different crops in a silty loam Haplustoll. *Field Crops Research*. **54**: 1, 29-38.

de la Vega A. J., Chapman, S. C. 2001. Genotype by environment interaction and indirect selection for yield in sunflower II. Three-mode principal component analysis of oil and biomass yield across environments in Argentina. *Field Crops Res.* **72**: 39-50.

Dickinson, H. G. 1993. Pollen dressed for success. *Nature* **364**: 573-474.

----- 1994. Self-pollination: simply a social disease? *Nature* **367**: 517-518.

----- 1995. Dry stygmas, water and self-incompatibility in Brassica. *Sex Plant Reprod.* **8**: 1-10.

Dickinson, H. G., Lewis, D. 1973. Cytochemical and ultrastructural differences between

intraspecific compatible and incompatible pollinations in *Raphanus*. *Proc. Roy. Soc. London.* **183 B**: 21-38.

Dickinson, H. G., Moriarty, J., Lawson, J. 1982. Pollen-pistil interaction in *Lilium longiflorum*: the role of the pistil in controlling pollen tube growth following cross-and self-pollinations. *Proc. Roy. Soc. London.* **215 B**: 45-62.

Dumas, C. 1973. Contribution à l'étude cyto-physiologique du stigmate III. Evolution et rôle du réticulum endoplasmique du cours de la sécrétion chez *Forsythia intermedia* Z.; étude cytochimique. *Z. Pflanzenphysiol.* **70**: 119-130.

Dumas, C., Rougier, M., Zandonella, P., Ciapolini, F., Cresti, M., Pacini, E. 1978. The secretory stigma in *Lycopersicum peruvianum* Mill.: Ontogenesis and glandular activity. *Protoplasma* **96**: 173-187.

Elleman, C. J., Dickinson, H. G. 1986. Pollen-stigma interactions in *Brassica*. IV. Structural reorganisation in the pollen grains during hydration. *J. Cell Sci.* **80**: 141-157.

Elleman, C. J., Franklin-Tong, V. E., Dickinson, H. G. 1992. Pollination in species with

dry stigma: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol* **121**: 414-424.

Esau, K. 1965. Plant anatomy. New York, London, Sidney: John Wiley.

Feoli, C. E. 1992. Inf. logros y avances. INTA, EEA Pergamino.

Fernandez-Martinez, J., Knowles, P. F. 1987. Inheritance of seed fatty acid composition in a cross between domesticated and wild annual sunflower. *Genet. Agr.* **41**: 83-95.

Frye, T. C. 1902. A morphological study of certain Asclepiadaceae. *Bot. Gaz.* **34**: 389-413.

Furness, C. A., Rudall, P. J. 2001: The Tapetum in Basal Angiosperms: Early Diversity. *International Journal of Plant Science* **162**: 375-392.

Galati, B., Monacci, F., Gotelli, M. M., Rosenfeldt, S. 2007 Pollen, Tapetum and Orbicule Development in *Modiolastrum malvifolium* (Malvaceae). *Annals of Botany* **99(4)**: 755-763

Gerstel, D. U. 1950. Self incompatibility studies in Guayule. *Genetics* **35**: 482-506.

Goldman, M. H. S., Goldberg, R. B., Mariani, C. 1994. Female sterile tobacco plants are produced by stigma specific cell ablation. *EMBO J.* **13**: 2976-2984.

González Roelants G., Vicién C., Gherza C., León A. 1997. El girasol en la República Argentina. Influencia de las especies silvestres. Informe preparado para la CONABIA. 21 pp.

Gunning, B. E. S., Pate, J. S. 1969. "Transfer cells"- plant cells with wall ingrowth specialized in relation to short distance transport of solutes: their occurrence , structure, and development. *Protoplasma* **68**: 107-133.

Habura, E. C. H. 1957. Parasterilitat bei Sonnenblumen. *Pflanzenzucht* **37**: 280-298

Hall, A. J., Chimenti, C. A., Vilella, F., Freier, G. 1985. Timing of water stress effects on yield components in sunflower. P.131-136. Proc. Int. Sunflower Conf., 11, Mar del Plata, Argentina. 10-13 Mar. Int. Sunflower Assoc., Toowoomba, Australia.

Hall, A. J., Connor, D. J., Whitfield, D. M., 1989. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water stressed sunflower crops. I. Estimates using labelled carbon. *Field Crop Research* **20**, 95-112

Hall, A. J., Whitfield, D. M., Connor, D. J., 1990. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water stressed sunflower crops. I. Estimates from a carbon budget. *Field Crop Research* **24**, 273-294

Hall, A. J., Connor, D. J., Whitfield, D. M., 1990. Root respiration during grain filling in sunflower: the effects of water stress. *Plant and soil* **121**: 57-66

Heiser, C. B. Jr. 1954. Variation and subspeciation in the common sunflower, *Helianthus annuus*. *The American Midland Naturalist* **51**: 287-305.

Heiser, C. B. Jr. 1978. Taxonomy of *Helianthus* and origin of domesticated sunflower. En: J.F. Carter (Ed.) Sunflower Science and Technology, Agronomy series 19, Am. Soc. of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, pp. 31-53.

Herd, Y. R., Beadle, D. J. 1980. The site of the self-incompatibility mechanism in

Tradescantia pallida. *Ann. Bot.* **45**: 251-256.

Herrero, M., Dickinson, H.G. 1979. Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraespecific matings. *J. Cell Sci.* **47**: 365-383.

Heslop-Harrison, J. 1969: An acetolysis-resistant membrane investing tapetum and sprogenous tissue in the anthers of certain Compositae. *Can. J. Botany* **47**: 541-542.

Heslop-Harrison, J. 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annu. Rev. Plant physiol.* **26**: 403-425.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. 1980. The pollen-stigma interaction in grasses. I. Fine structure and cytochemical of the stigmas of *Hordeum* and *Secale*. *Acta Bot. Neerl.* **29**: 261-276.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Knox, R. B, Howlett, B. 1973. Pollen wall protein: gametophytic and sporophytic fraction in the pollen wall of the Malvaceae. *Ann. Bot.* **37**: 403-412.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Barber, J. 1975. The stigma surface in incompatibility responses. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **188**: 287-297.

Heslop-Harrison, Y. 1981. Stigma characteristics and angiosperm taxonomy. *Norw. J. Bot.* **1**: 401-420.

Heslop-Harrison, Y., Shivanna, K. R. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 1233-1258.

Heslop-Harrison, Y., Heslop-Harrison, J., Shivanna, K. R. 1981. Heterostyly in *Primula*. Fine-structural and cytochemical features of the stigma and style in *Primula vulgaris* Huds. *Protoplasma* **107**: 171-187.

Heslop-Harrison Y., Reger B. J., Heslop-Harrison J. 1984. The pollen-stigma interaction in the grasses. 5. Tissue organization and cytochemistry of the stigma ("silk") of *Zea mays* L. *Acta Bot. Neerl.* **33**: 81-99.

Hiscock, S. J. 2000a. Genetic control of self incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae)- a successful colonising species. *Heredity* **84**: 10-19.

----- 2000b. Self incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *An. Bot.* **85** (suppl A): 181-190.

Hiscock, S. J., Coleman, J. O. D., Dewey, F. M., Dickinson, H. G. 1994. Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* **193**: 377-384.

Hiscock, S. J., Doughty, J., Dickinson, H. G. 1998. Unilateral incompatibility and the S (self-incompatibility) locus. Pp 31-46 en Owens, S. J., Rudall, P. J., eds. Reproductive biology in systematics, conservation and economic botany. Royal Botanic Gardens, Kew.

Hiscock, S. J., Hoedemaekers, K., Friedman, W. E., Dickinson, H. G. 2002. The stigma surface and pollen-stigma interactions in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae) following cross (compatible) and self (incompatible) pollinations. *Int. J. Plant Sci.* **163** (1): 1-16.

Hofmeister, W. 1849. Die Entstehung des Embryo des phaneragamen. Leipzig (en: Newcomb, 1973).

Horner, H. T. 1977: A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Amer. J. Botany* **64** (6): 745-759.

Howlett, B. J., Knox, R. B., Paxton, J. D., Heslop-Harrison, J. 1975. Pollen wall proteins: physicochemical characterization and role in self-incompatibility in *Cosmos bipinnatus*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **188**: 167-182.

Hughes, M. B., Babcock, E. B. 1950. Self-incompatibility in *Crepis foetida* L. Subsp. *Rhoeadifolia* Bieb. Schinz et Keller. *Genetics* **35**: 570-588.

Hulskamp, M., Kopczak, S. D., Horsejsi, T. F., Pruitt, R. E. 1995. Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant J.* **8**: 703-714.

Huysmans, S., El-Ghazaly, G. 1998: Orbicules in Angiosperms: Morphology, Function, Distribution, and Relation with Tapetum Type. *Botanical Review* **64**: 240—272.

Jensen, W. A., Fisher, D. B. 1969. Cotton embryogenesis: the tissues of the stigma and style and their relation to the pollen tube. *Planta* **84**: 97-121.

Jobson, S., Knox, R. B., Kenrick, J., Dumas, C. 1983. Plastid development and ferritin content of stigmas of the legumes *Acacia*, *Lotus* and *Trifolium*. *Protoplasma* **116**: 213-218.

Johansen, D. A. 1950. Plant embryology. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.

Johri, B. M. 1984. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlang- Berlin- Herdelberg-New York-Tokyo.

Johri, B. M., Ambegaokar, K. B., Srivastava, P. S. 1992: *Comparative Embryology of Angiosperms*. Vols 1 and 2. Springer-Verlag: Berlin.

Kandasamy, M. K., Paolillo, D. J., Faraday, C. D., Nasrallah, J. B. Nasrallah, M. E. 1989. The S-locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Devel. Biol.* **134**: 462-472.

Konar, R. N., Linskens, H. F. 1966. The morphology and anatomy of the stigma of *Petunia hybrida*. *Planta* **71**: 356-371.

Knox, R. B. 1973. Pollen-wall proteins: pollen-stigma interactions in ragweed and Cosmos (Compositae). *J. Cell Sci.* **12**: 421-443.

Laveau, J. H., Schneide, C., Berville, A. 1989: Microsporogenesis abortion in cytoplasmic male sterile plants from *H. petiolaris* or *H. petiolaris fallax* crossed by sunflower (*Helianthus annuus*). *Annals of Botany* **64**: 137—148.

Lindström, L., Pellegrini, C. N., Hernández, L. F. 2007. Histological development of the sunflower fruit pericarp as affected by pre- and early post-anthesis canopy shading. *Field Crops Research* **103 (3)**: 229-238.

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

Lush, W. M., Grieser, F., Wolters-Arts, M. 1998. Directional guidance of *Nicotiana alata* pollen tubes in vitro and on the stigma. *Plant Physiol.* **118**: 733-741.

Lush, W. M., Spurck, T., Joosten, R. 2000. Pollen tube guidance by the pistil of a Solanaceous plant. *Ann Bot.* **85** (suppl A): 39-48.

- Maheshwari, J. K. 1948. The angiosperm embryo sac. *Bot. Rev.* **14**: 1-56.
- 1950: An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill: New York.
- Maiti, I. B., Kolattukudy, P. E., Shaykh, M. 1979. Purification and characterization of a novel cutinasr from Nasturtium (*Tropaeolum majus*) pollen. *Arch. Biochem. Biophys.* **196**: 412-4423.
- Marc, J., Palmer, J. H. 1981. Photoperiodic sensitivity of inflorescence initiation and development in sunflower. *Field Crops Research* **4**: 155-164.
- Marin, F. R., Sentelhas, P. C., Húngaro, M. R. G. 2000. Sunflower potencial yield loss in the state of Sao Pablo, Brazil, due to water deficiency. *Sci. agric.* **57 (1)**: 1-6.
- Mibalyfalvy, L. 1962. Water requirement of sunflower grown as a second crop for green manuring. *Novenytermeles* **11**: 101-108.

Mattson O., Knox, R. B., Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. 1974. Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature* **247**: 298-300.

Meinke, H., Hammer, G. L., Want, P. 1993. Potential soil water extraction by sunflower on a range of soils. *Field Crops Research*. **32**: 1-2, 59-81.

Meric, C., Dane, F. 2004: Calcium oxalate crystals in floral organs of *Helianthus annuus* L. and *H. tuberosus* L. (Asteraceae). *Acta Biologica Szegediensis* **48 (1-4)**: 19-23.

Moreno, F., Pelegrin, F., Fernandez, J.E., and Murillo, J.M. 1997. Soil physical properties, water depletion and crop development under traditional and conservation tillage in southern Spain. *Soil-and-Tillage-Research*. **41**: 1-2, 25-42.

Mutti, J., Dosio, G. 2003. Estudio de la dormición en la producción de semillas híbridas de girasol. Programa de Ciencias Agrarias. Área de producción vegetal. Pre proyectos de monografías.

Nettancourt, D. 1997. Incompatibility in angiosperms. *Sex Plant Reprod* **10**: 185-199,

Newcomb, W., Steeves, T. A. 1971. *Helianthus annuus* embryogenesis; embryo sac wall projections before and after fertilization. *Bot. Gaz.* **132**: 367-371.

Newcomb, W. 1973a: The development of the embryo sac of sunflower *Helianthus annuus* before fertilization. *Can. J. Bot.* **51**: 863-878.

Newcomb, W. 1973b: The development of the embryo sac of sunflower *Helianthus annuus* after fertilization. *Can. J. Bot.* **51**: 879-898.

O'Brien, T. P., McCully, M. E. 1981: The study of plant structure. Principles and selected methods. Termarcarphi Pty. Ltd.: Melbourne, Australia.

Osaki, M., Shinano, T., Matsumoto, M., Ushiki, J., Shinano, M. M., Urayama, M., Tadano, T. 1995. Productivity of high-yielding crops. V. Root growth and specific absorption rate of nitrogen. *Soil-Science-and-Plant-Nutrition*. 1995, **41**: 4, 635-647.

Owens, S..J., Horsfield, N. J. 1982. Light and electron microscopic study of stigma in *Aneilema* and *Commelina* species (Commelinaceae). *Protoplasma* **112**: 26-36.

Palmer, J. H., Steer, B. T. 1985. The generative area as a site of floret initiation in the sunflower capitulum and its integration to predict floret number. *Field Crops Res.* **11**: 1-12.

Pandey, A. K. Introduction to the embryology of Angiosperms. 1997. CBS Publishers and Distributors. Daryaganj, New Delhi, India.

Pearse, A. G. E. 1961. Histochemistry, theoretical and applied. 2nd ed. Boston: Little Brown.

Plaut, Z. 1995. Sensitivity of crop plants to water stress at specific developmental stages: Reevaluation of experimental findings. *Israel Journal of Plant Sciences* **43** (2): 99-111.

Prakash, N. 1979. Embryological studies on economic plants. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 525-34

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

Psaras, G. 1984. On the structure of lettuce (*Lactuca sativa*) endosperm during germination. *Annals of Botany* **54**: 187-194.

Puech, J., and N. Gelfi. 1995. Water flows studied in lysimetry: water balance and nitrogen transfers. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France* **81**: 4 35-54.

Pullaiah, T. 1979: Embryology of *Adenostemma*, *Elephantopus* and *Vernonia* (Compositae). *Bot. Notiser* **132**: 51--56.

Poverene, M. M., Cantamutto, M. A., Carrera, A. D., Ureta, M. S., Salaberry, M. T., Echeverría, M. M., Rodríguez, R. H. 2000. El girasol silvestre (*Helianthus* spp.) en la Argentina: Caracterización para la liberación de cultivares transgénicos. *RIA* **31 (2)**: 97-116

Raghavan, V. 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biol Rev.* (Cambridge) **41**: 1-58.

----- 1997. Molecular Embryology of Flowering Plants. Cambridge. University Press. 33-35.

Raghavan, V., Torrey, J. G. 1963. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. *Am. J. Bot.* **50**: 540-551.

Robinson, R. G. 1971. Sunflower phenology-year, variety, and date of planting effects on day and growing degree-day summations. *Crop Science* **11**: 635.

Saumell, H. 1980. Girasol. Técnicas actualizadas para su mejoramiento y cultivo. Segunda Edición. Editorial Hemisferio Sur, S. A. Buenos Aires, Argentina. 161 p.

Sassen, M. M. A. 1974. The stylar transmitting tissue. *Acta Bot. Neerl.* **23**: 99-108.

Schneiter, A. A., Miller, J. F., 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop. Sci.* **21**: 901-903

Schulz, P., Jensen, W. A. 1971. *Capsella* embryogenesis: the chaazal proliferating tissue. *J. Cell. Sci.* **8**: 201-227.

Sedgley, M. 1981. Ultrastructure and histochemistry of the watermelon stigma. *J. Cell Sci.* **48**: 137-146.

Sedgley, M., Blesing, M. A. 1983. Developmental anatomy of the avocado stigma papilla cells and their secretion. *Bot. Gaz.* **144**: 185-190.

Sedgley, M., Buttrose, M. S. 1978. Structure of the stigma and style of the avocado. *Aust. J. Bot.* **26**: 663-682.

Seiler, J. G., Rieseberg, L. H. 1997. Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. En: A.A. Schneiter (Ed.) Sunflower Technology and Production, Agronomy series **35**, Am. Soc. Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, pp. 21-65.

Siddiqui, M. Q., Brown, J. F., Allen, S. J. 1975. Growth stages of sunflower and intensity indices for white blister and rust. *Plant Dis. Repr.* **59**: 7-11.

Stegman, E. C., Lemert, G. W. 1981. Sunflower yield vs. water deficits in major growth periods. *Transactions of the ASAE* **24 (6)**: 1533-1538, 1545.

Steer, B. T., Hocking, P. J. 1983. Leaf and floret production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as affected by nitrogen supply. *Ann. Bot.* **51**: 267-277.

Steeves, T. A., Sussex, I. M. 1972. Patterns in plant development. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Strittmatter, L. I., Galati, B. G., Monacci, F. 2000: Ubisch bodies in peritapetal membran of *Abutilon pictum* Gill.(Malvaceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **71**: 1-10.

Strasser, B., Werner, W. 1995. Influence of form and placement of N and P fertilizer on root development, phosphate uptake, and growth of sunflowers (*Helianthus annuus*, L.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). *Journal of Agronomy and Crop Science* **175** (3): 157-165.

Szabó, M., Gulyás, S., Frank, J. 1984: Comparative anatomy of the androecium of male sterile and fertile sunflowers (*Helianthus*). *Acta Botanica Hungarica* **30**: 67-73.

Talbot, M. J., Wasteneys, G., McCurdy, D., Offler, C. 2007. Deposition patterns of cellulose microfibrils in flange wall ingrowths of transfer cells indicate clear parallels with those of secondary wall thickenings. *Functional Plant Biology* **34**: 307-313

Texier, V. 1991. Effect of water-nitrogen interactions on leaf area and yield components of sunflower. *Helia* **14** (14): 1-8.

Tilton, V. R., Horner, H. T. Jr. 1980. Stigma, style, and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. *Am. J. Bot.* **67**: 1113 - 1131.

Treub, M. 1879. Notes due l'embryogenie de vuelques orchidées. Koninklikijke Akademie van Wetenschappen Vrhandelingen, Amsterdam.

Ustinova, E. I. 1964. Izmenshivost' zhenskogo gametofita u podsolnechinka (*Helianthus annuus* L.). (Variability of female gametophyte of sunflower (*Helianthus annuus* L.)) *Byull. Mosk. Obshchest. Ispyt. Prir. Otd. Biol.* **69**:111-117.

Uwate, W. J., Lin, J. 1981. Development of the stigmatic surface of *Prunus avium* L., sweet cherry. *Am. J. Bot.* **68**: 1167-1176.

Vasil, I. K. 1974. The histology and physiology of pollen germination and pollen tube growth on the stigma and style. In: Linskens HF (ed) *Fertilization in higher plants*. North -Holland. Amsterdam pp. 105-118.

Vasil, I. K, Johri, M. M. 1964. The style, stigma and pollen tube. *Phytomorphology* **14**:

352-369.

Vasil'ev, A. E. 1970. Ultrastructure of the stigma toid cells in *Lilium*. *Soviet Plant Physiol.* **17**: 1035-1044.

Vithanage, H. I. M. V., Knox, R. B. 1977. Development and cytochemistry of stigma surface and response to self and foreign pollination in *Helianthus annuus*. *Phytomorph.* **27**: 168-179.

Vraneanu, A. V. 1977. El Girasol. Ed. Mundi-Prensa.

Walnot, V., Brady, T., Clutter, M, Sussex, I. 1972. Macromolecular synthesis during plant embryogeny: rates of RNA synthesis in *Phaseolus coccineus* embryos and suspensors. *Develop. Biol.* **29**: 104-111.

Whitfield, D. M., Connor, D. J., Hall, A. J. 1989. Carbon dioxide balance of sunflower (*Helianthus annuus*) subjected to water stress during grain filling. *Field Crops Research* **20**: 65-80

Wilms, H. J. 1980. Ultrastructure of the stigma of spinach in relation to pollen

germination and pollen tube growth. *Acta Bot. Neerl.* **29**: 33-47.

Wolters-Arts, M., Lush, W. M., Mariani, C. 1998. Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* **392**: 818-821.

Wröbel, B., Bednarska, E. 1994. Nuclear DNA content and ultrastructure of secretory cells of *Vicia faba* L. stigma. *Acta Soc. Bot. Polon.* **63**: 139-145.

Yan, H., Yang, H-Y., Jensen, W. 1990. Ultrastructure of the developing embryo sac of sunflower (*Helianthus annuus*) before and after fertilization. *Can. J. Bot.* **69**: 191-202.

Yan, H., Yang, H-Y., Jensen, W. 1991. Ultrastructure of the micropyle and its relationship to pollen tube growth and synergid degeneration in sunflower. *Sexual plant reproduction* **4 (3)**: 166-175.

Zuloaga F.O, Morrone O.E. (Eds.) 1999. Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina. Monographs of Systematic Botany, Missouri Botanical Garden.