Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Nectarios extraflorales de especies de Vigna de la Argentina : morfología, origen, función

Ojeda, Fabiana Soledad

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ojeda, Fabiana Soledad. (2013). Nectarios extraflorales de especies de Vigna de la Argentina : morfología, origen, función. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Ojeda, Fabiana Soledad. "Nectarios extraflorales de especies de Vigna de la Argentina : morfología, origen, función". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Nectarios extraflorales de especies de *Vigna* de la Argentina: morfología, origen, función

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

Fabiana Soledad Ojeda

Director de tesis: Patricia S Hoc

Director Asistente: María Teresa Amela García

Consejero de Estudios: Patricia S. Hoc

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Reproductiva y Sistemática Experimental en Plantas Vasculares, DBBE, (FCEyN), PROPLAME-PRHIDEB (CONICET)

Lugar y fecha: Buenos Aires, 2013

Nectarios extraflorales de especies de *Vigna* de la Argentina: morfología, origen, función

Resumen

Se estudió la biología reproductiva de cuatro especies de *Vigna* nativas de la Argentina con potencial forrajero y/u ornamental, *Vigna adenantha* (G.F.W. Meyer) Maréchal, Mascherpa & Stainier, *Vigna candida* (Vell.) Maréchal Mascherpa & Stainier, *Vigna caracalla* (L.) Verdc. y *Vigna luteola* (Jacq.) Benth., en poblaciones naturales y en un cultivo en C.A.B.A. Se investigó la ontogenia, morfología y función de los nectarios extraflorales (NEFs) asociados a las inflorescencias, así como la utilidad de éstos para la taxonomía. Además se exploraron otros aspectos reproductivos relacionados con los NEFs plausibles de contribuir a esta disciplina: morfología de semillas y

plántulas, longevidad de las plantas, biología floral y sistema reproductivo. Los caracteres que resultaron útiles fueron la morfología de las semillas y de las plántulas, el tipo de germinación, la longevidad de las plantas, los atributos florales, la cantidad de NEFs, su anatomía y citología. Los NEFs se originan de flores abortivas. La secreción es granulocrina. La ontogenia del primer o único NEF funcional es concordante con el desarrollo del polen y del megagametofito de las flores del mismo nudo. Las hormigas que visitaron los NEFs no constituyeron una defensa biológica contra los fitófagos, tratándose de un mutualismo laxo.

Palabras claves: nectarios extraflorales, *Vigna*, Leguminosae, morfología, anatomía, ontogenia, biología floral, éxito reproductivo, insectos.

Extrafloral nectaries of species of *Vigna* from Argentina: morphology, origin, function

Abstract

The reproductive biology of four species of *Vigna* native from Argentina with potential value as forage or ornamental crops, *Vigna adenantha* (G.F.W. Meyer) Maréchal, Mascherpa & Stainier, *Vigna candida* (Vell.) Maréchal Mascherpa & Stainier, *Vigna caracalla* (L.) Verdc. and *Vigna luteola* (Jacq.) Benth., was studied in natural populations and in a culture in C.A.B.A. The ontogeny, morphology and function of the extrafloral nectaries (EFNs) associated with the inflorescences were investigated, as well as the utility of these for taxonomy. Additionally, other reproductive features related with the EFNs that could contribute to that discipline were studied: the morphology of the seeds

and seedlings, plant longevity, floral biology and reproductive system. The useful characters were the seed and seedling morphology, germination type, plant longevity, the floral atributes, quantity of EFNs, their anatomy and citology. The EFNs develop from abortive flowers. The secretion is granulocrine. The ontogeny of the first or single EFN coincides with the pollen and megagametophyte development of the flowers in the same node. The ants that visited the EFNs did not constitute a biological defense against phytophages, so this relationship must be interpreted as a lax mutualism.

Key words: extrafloral nectaries, *Vigna*, Leguminosae, morphology, anatomy, ontogeny, floral biology, reproductive system, insects.

Agradecimientos

A mis directoras, Dra. Patricia Hoc y Dra. Maria Teresa Amela García, por guiarme en este camino, en el cual por momentos me sentía completamente extraña. Por darme la oportunidad de compartir tantas charlas que me sirvieron para continuar en este camino, por la comprensión en los momentos en los que necesitaba, por todas las anécdotas de los viajes y de los momentos vividos durante mi formación y por esas cenas y almuerzos preparadas por Patricia durante las campañas.

A la Dra. Galatti, por ayudarme con los preparados de ultraestructura.

A la Dra. Sonia Rosenfelt, por compartir largas charlas sobre algunos y muchos temas y por ayudarme con los preparados cuando lo necesitaba.

A las Dras. Alejandra Rebichich y Ma. Pia Mom, por las charlas y los consejos.

Al Ing. Ramón Palacio, con quien compartí largas charlas.

Al Dr. Pblo Picca por la localización de *V. luteola* en el predio de la facultad.

A la Dra. Alicia Burghardt por compartir el espacio.

Al CONICET por la beca otorgada, con la cual pude financiar mi formación.

A la UBA por brindarme el espacio en el cual pude realizar esta tesis.

A Nelson, mi compañero en este camino porque supo amarme, acompañarme, ayudarme y escucharme. Gracias por tanta paciencia y aliento en todos los momentos vividos. Te amo mi vida.

A mis padres, fuente de inspiración en toda mi vida, porque me enseñaron los verdaderos valores de la

vida, creo que decirles que los quiero y gracia es poco para todo lo que siento y me dieron.

A mis hermanas por bancarme todas las veces que no estuve y darme una mano cuando más la necesitaba, escucharme y, por lo más importante, darme tanto amor, las quiero mucho hermanitas.

A mis sobrinos que a pesar de querer estar juntos entienden que no siempre se puede pero hacen lo posible por compartir todo conmigo, los amo amores de la tía.

A mis cuñados, que tienen que aguantar a su cuñadita mal humorada, gracias por compartir tantos lindos momentos conmigo.

A mis hermanas de la vida, Pato y Caro, quienes siendo tan diferentes me complementan totalmente. Pato gracias por llorar conmigo cuando lo necesitaba, por escucharme, escucharme y escucharme tanto que ni yo me aguantaba, gracias por las clases de estadística, historia y vida que compartimos juntas y que espero

siempre lo hagamos, por compartir tu familia y tantas cosas más que me quedo corta agradeciendo. Caro que puedo decir me escuchas y me haces reír que más puedo pedir, compartimos tantos momentos que ahora que estas lejos siento que un pedacito mío ya no está. Las quiero mucho amiguitas y agradezco a la vida haberlas conocido.

A Nélida porque a pesar de estar lejos me siento muy cerca tuyo y agradezco tenerte como amiga, gracias por los momentos compartidas.

A Jero, por las charlas y su gran ayuda en la manipulación de los datos.

A Euge y Fran, por prestarme una oreja y su presencia cuando necesitaba y, particularmente a vos Fran por ayudarme con la determinación de las hormigas.

A mis suegros y cuñados por la comprensión durante el camino transitado.

A Norita, mi amiga, compañera y guía en muchos de los momentos dolorosos y felices, muchísimas gracias por estar y permanecer.

A Irene mi amiga y profe de inglés que me enseñó con el ejemplo tanto de la vida que no tengo palabras para agradecerte.

A Mabel con quien compartí largas charlas durante los congresos y siempre que necesite me tendió una mano.

A Trini por la hospitalidad cuando fui a Salta.

A Mariana por convertirse en fotógrafa durante el viaje de prospección a Concordia.

A Willi por las fotos de la Reserva Rivera Norte.

A la Dra. Ángela Etcheverry por ayudarme en la localización y muestreo de *V. caracalla* en Salta.

Y especialmente a Francisquito, quien día a día me acompaña y que sin saberlo se convirtió en lo más importante en mi vida, te amo mi hijo.

Dedicada a Francisquito que sin proponérselo me trajo alegría, luz y felicidad.

Índice

Resumen..... I

Abstract III

Agradecimientos..... V

Dedicatoria X

OBJETIVOS..... 1

Objetivo general 2

Objetivos específicos..... 3

HIPÓTESIS 5

INTRODUCCIÓN GENERAL..... 8

Descripción general de las plantas..... 9

Distribución del género en la Argentina..... 10

Aspectos taxonómicos 11

Importancia económica 13

Consideraciones generales..... 15

Fundamentación de los estudios presentados en cada capítulo..... 16

Primer capítulo. Morfología de las semillas y de las plántulas16

Segundo capítulo. Biología floral y sistema reproductivo 19

Tercer capítulo. Disposición, morfología, anatomía y ontogenia de los NEFs..... 21

Cuarto capítulo. Interacción de los NEFs con los libadores. . 24

MATERIALES Y MÉTODOS..... 29

Especies estudiadas..... 30

Origen, hábitat y distribución de las especies estudiadas 31

Procedencia del germoplasma con que se llevaron a cabo los cultivos 33

Sitios de estudio..... 35

Análisis preliminar (2008) 36

Análisis definitivo (2010- 2012)..... 37

a) En poblaciones naturales..... 37

b) En cultivo experimental 38

Aspectos estudiados y métodos respectivos 41

Morfología de las semillas y de las plántulas 41

Caracteres de las semillas..... 41

Caracteres de las plántulas..... 42

Contenido del hipocótilo reservante..... 44

Biología floral..... 44

Receptividad estigmática y secreción del néctar 45

Fases florales y visitantes..... 45

Sistema reproductivo (experimentos de polinización controlada) 46

Atractivos secundarios..... 48

Análisis de la carga polínica 48

Disposición, morfología, anatomía y ontogenia de los nectarios extraflorales..... 49

Preparaciones histológicas y observaciones con microscopio óptico (MO)..... 49

Observaciones con microscopio electrónico de barrido (MEB)..... 50

Observaciones con microscopio electrónico de transmisión (MET)..... 51

Análisis de la interacción de los NEFs con insectos visitantes52

Observaciones en el cultivo..... 52

Experimentos de exclusión de visitantes de los NEFs.. 53

RESULTADOS 56

CAPÍTULO I: MORFOLOGÍA DE LAS SEMILLAS Y LAS PLÁNTULAS ... 57

Introducción **58**

Resultados **62**

Caracteres de las semillas **62**

Caracteres cuantitativos y cualitativos **62**

Análisis comparativo de los caracteres cuantitativos ... **68**

Morfología de las plántulas **70**

Longevidad de las plantas y prosperidad del cultivo **75**

Clave para diferenciar a las especies **80**

CAPÍTULO II: BIOLOGÍA FLORAL Y SISTEMA REPRODUCTIVO **84**

Introducción **85**

Resultados **87**

Características comunes de *V. adenantha* y *V. candida* **87**

Atractivos y estadios florales **89**

V. adenantha **89**

V. candida **91**

Néctar **93**

V. adenantha **93**

V. candida **93**

Visitantes **93**

V. adenantha 94

Taxa registrados y su actividad en las flores 94

Polen transportado 96

V. candida 98

Taxa registrados y su actividad en las flores 98

Polen transportado 100

Sistema reproductivo..... 102

V. adenantha 102

V. candida 102

V. caracalla..... 102

V. luteola 103

CAPÍTULO III: DISPOSICIÓN, MORFOLOGÍA, ANATOMÍA Y ONTOGENIA DE LOS NEFs 104

Introducción..... 105

Resultados 108

Morfología general de las inflorescencias..... 108

Morfología y anatomía de los NEFs 112

Ontogenia de los nectarios extraflorales 114

V. adenantha 114

V. candida 124

V. caracalla..... 131

V. luteola 138

Esporogénesis y gametogénesis 148

Período de actividad de los NEFs en cada eje secundario..... 151

CAPÍTULO IV: INTERACCIÓN DE LOS NEFS CON SUS VISITANTES153

Introducción..... 154

Resultados..... 157

Identidad y actividad de los visitantes..... 157

Análisis preliminares (2008) en poblaciones naturales 160

Análisis definitivo (2010-2012)..... 162

a) En poblaciones naturales..... 163

b) En el cultivo experimental 164

Experimentos de exclusión de visitantes de los NEFs 168

a) En poblaciones naturales..... 170

b) En el cultivo experimental 171

V. adenantha 172

V. candida 174

V. caracalla..... 176

V. luteola 178

c) Comparaciones entre sitios 180

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 183

Discusión..... 184

Morfología de las semillas y de las plántulas 184

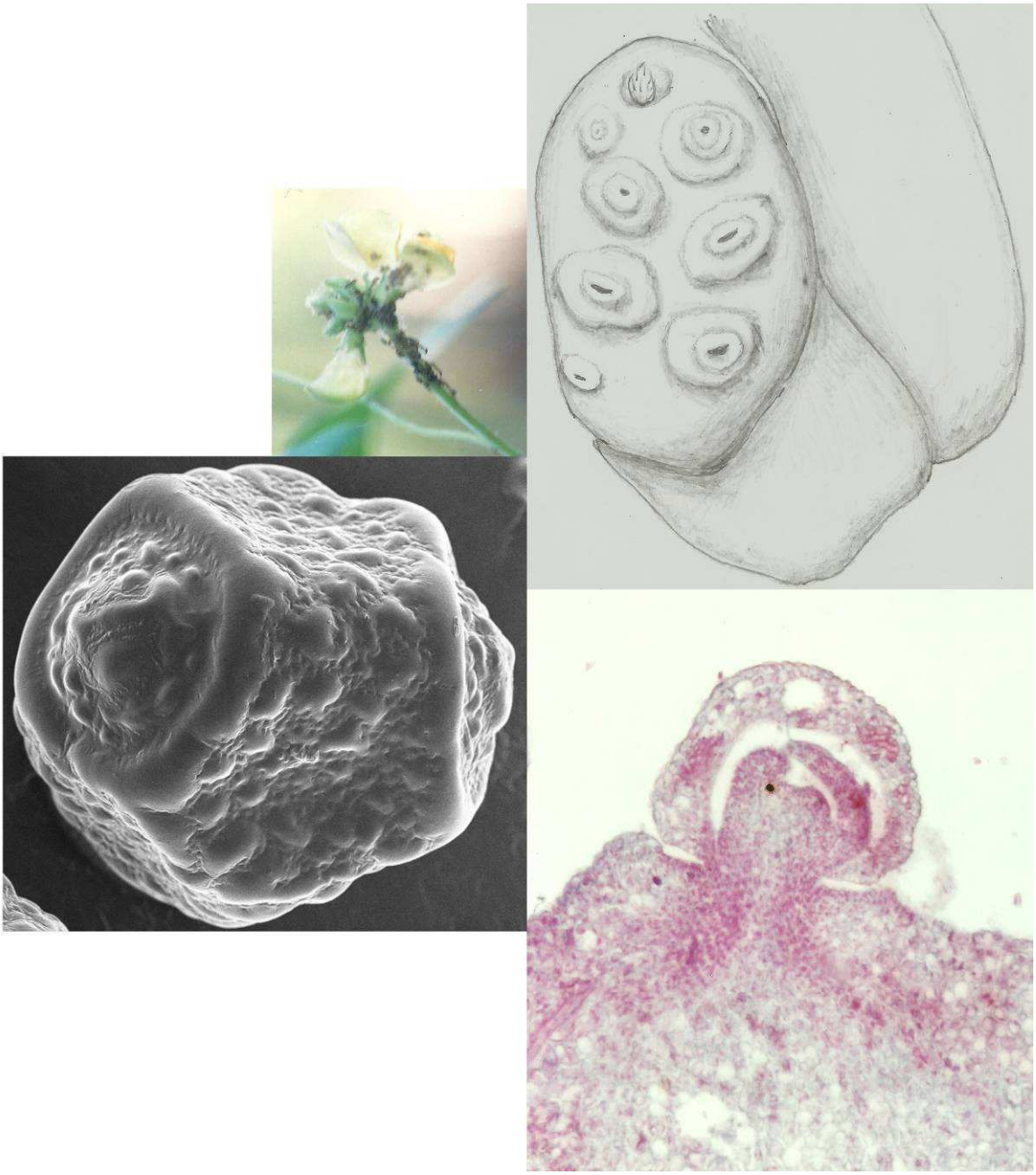
Biología floral y sistema reproductivo 188

Disposición, morfología, anatomía y ontogenia de los NEFs 193

Análisis de la interacción NEFs- Visitante..... 199

Conclusión..... 205

BIBLIOGRAFÍA 211



OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la ontogenia, la disposición, la morfología y la función de los nectarios extraflorales asociados a las inflorescencias de especies nativas de *Vigna*, así como la utilidad de éstos y otros caracteres reproductivos relacionados y relevantes para la taxonomía, tales como la biología reproductiva que involucra el proceso de germinación, longevidad de las plantas y biología floral.

Objetivos específicos

Analizar en cada especie y comparativamente:

1) La morfología de las semillas, el tipo de germinación, el desarrollo de las plántulas y la longevidad de las plantas.

2) La biología floral, el sistema reproductivo y el éxito reproductivo.

3) La disposición, morfología y ontogenia de los nectarios extraflorales.

4) La citología del estadio secretor de los nectarios extraflorales, así como el período de secreción y su relación con la producción de frutos y semillas.

5) La interacción de los nectarios extraflorales con los insectos visitantes de éstos y su posible influencia sobre el éxito reproductivo.

6) La variabilidad temporal y espacial en la asociación entre los nectarios extraflorales y sus visitantes.

7) El valor y la utilidad taxonómica de los caracteres analizados (de las semillas, plántulas, la biología reproductiva y los nectarios extraflorales).

HIPÓTESIS

Se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

1) La morfología seminal tiene valor taxonómico.

2) El tipo de germinación es el mismo para todos los integrantes del género.

3) La morfología de las plántulas tiene valor taxonómico.

4) La longevidad de las plantas difiere entre especies.

5) La polinización es entomófila.

6) Las especies no son autocompatibles.

7) Los nectarios extraflorales se originan de flores abortivas.

8) Las características anatómicas y citológicas de los NEFs difieren según la especie.

9) El período de secreción de los nectarios extraflorales se extiende desde el inicio de la floración hasta la maduración de los frutos.

10) La presencia de los libadores de los nectarios extraflorales aumenta la producción de frutos y semillas de las plantas.

11) La asociación entre los visitantes de los nectarios extraflorales varía temporalmente.

12) La asociación entre los visitantes de los nectarios extraflorales varía geográficamente.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Descripción general de las plantas

Son hierbas rastreras o trepadoras, sin pelos uncinados. Las hojas son trifolioladas, con folíolos lineales u ovados, de estípulas bilobadas, sagitadas o peltadas. Las flores se disponen en racimos que poseen ejes secundarios acotados portadores de nectarios extraflorales (NEFs) y flores; las brácteas y bractéolas florales (si están presentes) son caducas. Las flores presentan cáliz con los dientes superiores e inferiores soldados en una estructura cupuliforme o levemente bilabiada; el estandarte es a veces asimétrico; la quilla es sigmoidea, espiralada o recurvada; el estilo es barbado por debajo del estigma formando un cepillo estilar; el estigma es de inserción lateral, subterminal o terminal, y, en este caso, los tricomas estilares forman una coronita de pelos. Las

legumbres son coriáceas, no apergaminadas (Palacios & Hoc, 2001).

Distribución del género en la Argentina

Este género tiene distribución pantropical, comprende 80 especies, agrupadas en 7 subgéneros, divididos a su vez en secciones (Maréchal *et al.*, 1978). Las 8 especies que crecen en la Argentina representan a 3 de los subgéneros y 6 secciones, cuya sinopsis fue realizada por Palacios & Hoc (2001). En nuestro país, las poblaciones se distribuyen a lo largo de las selvas marginales desde Misiones hasta Buenos Aires (Provincia Fitogeográfica Paranaense) y en las Yungas, territorios fitogeográficos definidos por Cabrera (1976). Sólo una especie se comporta como ruderal, acompañando la antropización del ambiente, desde Salta hasta Córdoba (Hoc *et al.*, 2007).

Aspectos taxonómicos

Los caracteres seminales, la morfología de las plántulas y plantas, así como la de los granos de polen han sido objeto de estudios taxonómicos que condujeron a la subdivisión del género *Vigna* (Maréchal *et al*., 1978; Subramanian, 1979; Delgado Salinas *et al.*, 1993). Otros estudios realizados más recientemente con el objeto de analizar la división taxonómica abarcan fueron el ADN de los cloroplastos (Delgado Salinas *et al.*, 2006; 2011) y el análisis de las isoencimas (Jaaska, 2001). Si bien estos estudios son completos y otorgan una nueva clasificación (Vaillancourt *et al.*, 1993; Delgado Salinas *et al.*, 2011) o bien mantienen la misma pero con el agregado de nuevas especies (Jaaska, 2001) en el género, en esta tesis se siguió el criterio de Maréchal *et al.* (1978) porque es el único más abarcativo y además

porque los estudios moleculares de Delgado Salinas (2011) y Jaaska (2001) son parciales en *Vigna*.por otro lado los análisis realizados por Vaillancourt *et al.* (1993) sobre ADN de cloroplastos sugieren que las especies comprendidas en el subgénero *Sigmoidotropis* (exclusivas del neotrópico) constituirían un clado separado de los restantes subgéneros, la mayoría asiáticos, por lo tanto propone que el género sería polifilético. Sin embargo es interesante notar que los análisis de ADN o isoenzimas confían en la determinación eficiente del germoplasma que manejan, pero no realizan una prueba contundente en el campo, tampoco analizan la ontogenia o la morfología. Por lo tanto, el aporte de esta tesis es definir el estatus específico de las especies estudiadas que tienen potencial, a los fines de su buen uso con base en una adecuada determinación y exhaustivos estudios de campo y laboratorio.

Sobre la base de esto es relevante conocer con mayor profundidad otros caracteres de las especies neotropicales dado que actualmente, debido a que se desconocen muchos de los aspectos sobre el ciclo de vida y longevidad de las especies, aún no existe un acuerdo sobre los caracteres que aportan a la subdivisión genérica.

Importancia económica

En el mundo se cultivan 6 especies de *Vigna* (Jain & Mehra, 1980), de las cuales *V. unguiculata* ("caupí") (L.) Walp. es la especie más difundida, como fuente económica de proteínas seminales para consumo humano (Ugborogho & Agomo, 1989), como cultivo de cobertura por su nodulación con bacterias fijadoras de nitrógeno (Woolwine & Reagan, 2001) y como forraje, abono verde y para la rotación de cultivos (Tell Bertoni, 1908).

De las especies que se encuentran en la Argentina, las que tratarán en esta tesis, son económicamente importantes como forrajeras promisorias en áreas subtropicales y tropicales *Vigna adenantha* y *V. luteola* (Fernández *et al*. 1988; Lahitte, 2004; Schinini *et al.*, 2004; Izaguirre, 2005); particularmente en tierras inundables, donde las propiedades de nitrificación son más valiosas, explotándose en el Delta por la apicultura (Kondus *et al.*, 2010). Además, *V. adenantha*, *V. candida* y *V. caracalla* tienen características que les confieren valor ornamental potencial (Hoc & Ojeda 2013; Etcheverry, 2005, 2008). Además a excepción de *V. candida*, las otras especies son utilizadas en infusiones o decocciones en la medicina popular y como fuente alimenticia en los conurbanos bonaerense y platense (Hurrell *et al.*, 2011). También se registró el uso de plantas de *V. adenantha* en la pesca y el acarreo en pueblos originarios del Chaco (Scarpa, 2007).

A pesar de estas numerosas utilidades, ninguna de las especies se cultiva aún con fines comerciales en nuestro país.

Consideraciones generales

Teniendo en cuenta el potencial agronómico de estas especies nativas, para entender los factores que intervienen en su establecimiento y distribución, y, que la taxonomía aún no está resuelta satisfactoriamente, se vio la necesidad de estudiar aspectos aún desconocidos para las especies en cuestión, entre ellos, la morfología de las semillas, el proceso de la germinación, el desarrollo de las plántulas, la longevidad de las plantas, su modo de reproducción y algunos factores que influyen en ésta. Estos temas se presentan en esta tesis en cuatro capítulos, en cada uno de los cuales se abordaron cada

uno de los aspectos pendientes de conocimiento o desconocidos en su totalidad, detallados seguidamente.

En el primer capítulo se estudió la morfología de las semillas y de las plántulas.

En el segundo capítulo se ampliaron los conocimientos preexistentes sobre la biología floral y el éxito reproductivo de algunas especies.

En el tercer capítulo se analizó la disposición, morfología, anatomía y ontogenia de los NEFs.

En el cuarto capítulo se puso a prueba la función de los NEFs.

Fundamentación de los estudios presentados en cada capítulo

Primer capítulo. Morfología de las semillas y de las plántulas

¿Por qué es importante estudiar la morfología de las semillas y de las plántulas?

Tanto los caracteres anatómicos como morfológicos son útiles para distinguir los taxones en la etapa de semilla en diferentes niveles taxonómicos como por ejemplo, a nivel de familia (Gunn, 1981), subfamilia (Boelcke, 1946) o especie (Boelcke, 1946; Palacios & Bravo, 1974; Corner 1976; Alsina 1988; Chernoff *et al.*, 1992; Leython & Jâurgui, 2008; Paulino *et al.*, 2010). Esto también es válido para las plántulas, donde también se pueden identificar caracteres que permitan diferenciar, ya sea familias (Sánchez & Hernández, 2004), géneros (Rodriguez & Tozzi, 2007a; 2007b; 2008) o especies (Dottori *et al.* 2000; Perícola *et al*. 2004; Kodama & Sartori, 2007). Estas características pueden emplearse en la elaboración de claves, tanto para una o varias categorías taxonómicas, por ejemplo, subfamilia

(Boelcke, 1946; Kirkbride *et al.* 2003), géneros (Gunn, 1981; Kirkbride *et al.* 2003) o especies (Palacios & Bravo, 1974). Los caracteres de las plántulas fueron utilizados por Rodriguez & Tozzi (2007a; 2007b; 2008) en el reconocimiento de *Guianodendron* y *Leptolobium*, dos géneros nuevos dentro de las Papilionoideae, la separación de *Poecilanthe* y *Cyclolobium*, dos géneros pertenecientes a las Papilionoideae y considerados filogenéticamente muy cercanos (Rodriguez & Tozzi, 2007a), así como también la diferenciación de los géneros dentro del clado *Vatairea* (Papilionoideae) (Rodriguez & Tozzi, 2007b). A su vez, estos caracteres se han empleado para identificar a las plántulas que crecen en ciertas regiones (Marino *et al.* 2008; Zamora-Cornelio *et al.* 2010).

Desde un punto de vista más aplicado, el reconocimiento de las semillas por su morfología permite conocer la composición y estructura del banco de semillas en determinados ambientes, pudiendo

analizarse los cambios en la vegetación y su impacto ecológico (De Souza Maia *et al.*, 2006; Gianaccini *et al.*, 2009), mientras que el conocimiento de las plántulas posibilita la identificación de las especies en etapas tempranas del desarrollo siendo de gran utilidad en estudios ecológicos y agronómicos (Lovey et al., 2010).

Segundo capítulo. Biología floral y sistema reproductivo

¿Cuán necesario es el estudio de la Biología floral y el sistema reproductivo?

El estudio de la biología floral permite caracterizar la actividad de los insectos que llegan a las plantas, permitiendo reconocer a los visitantes legítimos e ilegítimos (Faegri & van der Pijl, 1979) y

las funciones que cada uno desempeña en las flores (Inouye, 1980), el tipo de reproducción y la forma de dispersión de las semillas, la cual se relaciona con el establecimiento de las plántulas. El conocimiento de estos caracteres es indispensable a la hora de explotar el potencial agrícola de las plantas, principalmente de estas especies que poseen importantes características nitrificantes.

La polinización en las plantas puede llevarse a cabo por diferentes agentes, siendo las abejas los más importantes dentro de las Leguminosae (Kenrick et al., 1987; Agulló *et al.*, 1993; Brizuela *et al.*, 1993; Hoc & Amela García, 1998; Vaz *et al.*, 1998; Etcheverry *et al.*, 1999; 2001; Hoc *et al.*, 2003), y la melitofilia es el síndrome más diversificado y más especializado (Faegri & van der Pijl, 1979). A pesar de los numerosos trabajos en este grupo, todavía existen especies cuya biología floral se desconoce o se conoce parcial o erróneamente, aunque, como señalan Vaz *et al.* (1998)

la presencia del polinizador en *V. unguiculata* podría tener un rol complementario en la producción de frutos y semillas. Por otro lado, la posibilidad de hibridación y el polimorfismo floral nos permiten determinar si una especie puede llegar a tener características colonizadoras, como en el caso de *Vigna minima*, donde se vio que la asociación de estas dos variantes permitiría a esta especie expandir su área de distribución (Gopinathan & Babu, 1987). Es imprescindible que se examine esta capacidad en los casos de simpatría, ya sea en poblaciones naturales o en cultivos mixtos, pues determinará la producción y la variabilidad que se puede obtener o la estabilidad que se pretende mantener.

Tercer capítulo. Disposición, morfología, anatomía y ontogenia de los NEFs

¿Por qué interesa el estudio ontogenético de los nectarios extraflorales?

Los nectarios extraflorales (NEFs) se pueden distinguir de los florales ya sea por la posición o la función. Caspary (1848) los distinguió por la posición, denominando “florales” a los que se sitúan en alguna parte de una flor, y “extraflorales” a los ubicados en estructuras vegetativas. Delpino (1875) los clasificó según su función, llamando “florales” a los involucrados en forma directa en la polinización y “extraflorales” a los asociados con otras funciones. Así y todo, debido a la diversidad, amplia distribución, variados modos de desarrollo y su relación con otros órganos de las plantas, la clasificación de los NEFs debe ser abarcada comparativamente (Elías, 1983).

Los NEFs asociados a inflorescencias o flores no implicados directamente con el proceso de polinización son comunes (Elías, 1983). Pueden disponerse en forma

dispersa a lo largo del eje de la inflorescencia (Bentley, 1977a), en la cara abaxial de las brácteas (Rickson & Rickson, 1998), en los pedicelos (Keller, 1977), cerca de la base de las flores (Elías, 1983) o en la cara abaxial de los sépalos (Anderson & Simon, 1985).

NEFs asociados a flores o inflorescencias se han encontrado en varios géneros de Leguminosae (Elías, 1983), destacándose su relevancia taxonómica (Bhattacharyya & Maheshuari, 1971). En *Vigna*, los nectarios extraflorales se hallan en el eje de la inflorescencia (Bentley, 1977b) y permiten distinguir a *Vigna* de *Phaseolus* L. (McKey, 1989).

Existen pocos estudios sobre el desarrollo ontogenético de los NEFs (Maheshuari, 1954; Ojehomon, 1968; Sousa Paiva & Rodriguez Machado, 2010). Los NEFs pueden tener variados orígenes (Diaz Catelazo *et al.*, 2005), dependiendo de su ubicación, como la epidermis forliar (Maheshuari, 1954) o flores

abortivas (Ojehomon, 1968). Tucker (1987) mencionó la presencia de flores rudimentarias en el eje secundario exandido de las inflorescencias de *Vigna radiata*, refiriendose a que dichas flores no desarrolladas devienen en nectarios, pero no describió el desarrollo de estos. Dada la variedad de ubicaciones y orígenes de éstos, es interesante conocer su disposición, ontogenia y período de actividad, para relacionarlos con su función y con su utilidad taxonómica.

Según las consideraciones antes mencionadas los NEFs que se estudian en esta tesis se denominan según la definición de Delpino (1875).

Cuarto capítulo. Interacción de los NEFs con los libadores.

¿Cuál es el fin de analizar la función de los NEFs?

Los seres vivos se relacionan con otras especies a través de diferentes tipos de asociaciones biológicas que permiten la subsistencia y/o reproducción de ambos o alguno de los individuos involucrados con una tasa reproductiva superior que cuando no participan de la interacción (Begon *et al.*, 1988). Como ejemplos de ellas se pueden mencionar relaciones mutualistas, en las cuales ambas especies se ven beneficiadas, y el comensalismo, en la cual sólo una especie se ve favorecida mientras la otra no se beneficia ni se perjudica (Begon *et al.*, 1988).

Dentro de las interacciones mutualistas existe un tipo de relación particular establecida entre las hormigas y las plantas, la mirmecofilia, donde las plantas denominadas mirmecófilas, presentan determinadas estructuras capaces de proporcionar abrigo o alimento a las hormigas a cambio de protección, en su mayoría contra fitófagos (Bentley, 1977a; Delabie & Fernández, 2003; del Val & Dirzo,

2004). Sin embargo, este recurso no siempre es utilizado en forma especialista por estos himenópteros (Delabie & Fernández, 2003; del Val & Dirzo, 2004), haciendo que este tipo de explotación ocurra en un gradiente de dependencia entre los interactuantes, desde un mutualismo obligatorio, en el cual la presencia de ambos organismos es indispensable para la subsistencia de cada uno, hasta un mutualismo laxo, en el cual sólo las hormigas utilizan a las plantas como recurso ocasional (del Val & Dirzo, 2004). Una de las principales estructuras a través de las cuales las plantas establecen este tipo de interacción son los nectarios extraflorales o NEF (Bentley, 1977a; Keller, 1977; 1989; Hölldobler & Wilson, 1990; Delabie & Fernández, 2003; del Val & Dirzo, 2004).

En los casos de mutualismo laxo (facultativo) una sola especie de planta puede estar asociada a varias especies de hormigas (del Val & Dirzo, 2004). La labilidad de esta interacción parece depender de

varios factores, tales como la agresividad de los formícidos intervinientes, la densidad relativa de éstos, los niveles de herbivoría; por lo tanto, ocurrirían variaciones de índole espacial y temporal (Bentley, 1977a, del Val & Dirzo, 2004). Incluso se ha comprobado que plantas introducidas en un sitio pueden ser colonizadas y defendidas por hormigas (Howe & Westley, 1988).

Katayama & Suzuki (2010) demostraron que la exclusión de los herbívoros es efectiva cuando la cantidad de hormigas supera un umbral, a partir del cual el tiempo de permanencia de los herbívoros en la planta disminuye a medida que aumenta la cantidad de formícidos patrulladores.

Richards (1986) postuló que la función de las hormigas visitantes de los nectarios extraflorales asociados a flores es espantar a los ladrones de néctar perforadores del perianto y alejar a insectos pequeños respecto del tamaño de la flor en cuestión,

los cuales son incapaces de polinizarlas. A diferencia de la abundancia de trabajos sobre el rol de las hormigas libadoras de nectarios extraflorales presentes en partes vegetativas de las plantas, son escasos los trabajos que versan sobre el efecto de insectos visitantes de NEFs asociados a inflorescencias y su probable incidencia en el éxito reproductivo de las plantas (Bentley, 1977a; Keller, 1980; Vesprini et al., 2003). Por esto, el análisis experimental de la función de los NEFs permitiría entender las posibles ventajas que estas estructuras pueden otorgar a las especies de *Vigna*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies estudiadas

Se estudiaron las siguientes especies con relevancia económica y más abundantes presentes en la Argentina:

- *Vigna adenantha* (G.F.W. Meyer) Maréchal, Mascherpa & Stainier

- *Vigna candida* (Vell.) Maréchal Mascherpa & Stainier.

- *Vigna caracalla* (L.) Verdc.

- *Vigna luteola* (Jacq.) Benth.

Según la clasificación de Maréchal *et al.* (1978), estas especies están incluidas en dos Subgéneros y cuatro Secciones (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las especies estudiadas de *Vigna* según Maréchal *et al.* (1978).

Subgénero	Sección	Especie
Sigmoidotropis	*Leptostron*	*V. adenantha*
	Sigmoidotropis	*V. candida*
	Caracallae	*V. caracalla*
Vigna	*Vigna*	*V. luteola*

Origen, hábitat y distribución de las especies estudiadas

V. adenantha: es de origen neotropical y se naturalizó en el resto de las áreas tropicales. Es de hábito ripario, en la Argentina habita bañados y bordes de cursos de agua, distribuyéndose en las Selvas marginales de la Provincia Fitogeográfica Paranaense y del Distrito Chaqueño Oriental (Provincia Fitogeográfica Chaqueña) y en las Selvas de transición

de la Provincia fitogeográfica de las Yungas, regiones fitogeográficas definidas por Cabrera (1976). Se encuentra desde 0 hasta 700 m.s.m. en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Misiones, Formosa, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Buenos Aires (Palacios & Hoc, 2001).

V. candida: es una especie neotropical cuya área incluye América Central y Sudamérica. En la Argentina habita las Selvas marginales de la Provincia Fitogeográfica Paranaense, desde 0 hasta 500 m.s.m. y las Selvas de transición de la Provincia Fitogeográfica de las Yungas, desde 0 hasta 700 m.s.m, en las provincias de Misiones, Corrientes y Salta (Palacios & Hoc, 2001).

V. caracalla: esta especie es neotropical cuya área abarca Sudamérica. En la Argentina habita en las Selvas marginales de la Provincia Fitogeográfica

Paranaense y en las Selvas de transición y montanas de la Provincia Fitogeográfica de las Yungas, entre 0 y 1500 m.s.m., en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Formosa, Misiones, Corrientes y Buenos Aires (Palacios & Hoc, 2001).

V. luteola: es originaria de África y se dispersó por todo el área pantropical, a lo largo de los márgenes de cuerpos de agua. En la Argentina habita las Selvas marginales de la Provincia Fitogeográfica Paranaense, desde 0 hasta 500 m.s.m. Se distribuye en las provincias de Formosa, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Buenos Aires, Jujuy, Salta, Santiago del Estero y Córdoba (Palacios & Hoc, 2001; Hoc *et al*., 2005).

Procedencia del germoplasma con que se llevaron a cabo los cultivos

V. adenantha: ARGENTINA. Chaco: Barranqueras, T. Meyer 755 (SI); Las Palmas, E. Pueyrredón 17918 (SI). Corrientes: Dpto. Capital, EBCO, 20/02/2009, Hoc 396, 397 (BAFC). Dpto. San Cosme, R. Paraná y Ayo.: San Juan, A. Schinini y C. Quarín 11545 (SI). Delta, Águila Negra, A. Burkart 7654 (SI).

***V. candida*:** ARGENTINA. Salta: Dpto. Capital, Calle Riobamba 655, 27/02/2008, F. Ojeda s/n in Hoc 402 (BAFC). Corrientes: Dpto. Mburucuyá, Estancia Sta. Teresa, A. Burkart 19597 (SI). Misiones: Dpto. San Ignacio, Santa Ana, 13/4/1992, Hoc 236 (BAFC).

V. caracalla: ARGENTINA. Salta: Dpto. Chicoana, Los Los, A. Krapovickas *et al.* 28312 (SI); Dpto. Gral Güemes, Finca del Desmonte al este de Betania, 24/02/2008, F. Ojeda s/n in Hoc 403 (BAFC). Chaco: Dpto. San Fernando, Resistencia, Boca del Río Negro,

A. G. Schulz 1188 (SI). Dpto. La Viña, costado de la ruta, 1/III/1988, Hoc 76, 78 (BAFC).

V. luteola: ARGENTINA. Buenos Aires: Pdo. San Isidro, Reserva Ribera Norte, 26/01/2008, F. Ojeda & P. Hoc in Hoc 401 (BAFC). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ciudad Universitaria, Rivera del Río de la Plata 27/05/2010, F. Ojeda & P. Hoc in Hoc 427, 428 (BAFC).

Sitios de estudio

Una parte del trabajo se desarrolló en poblaciones naturales mientras que otra se desarrolló en un cultivo establecido a partir de semillas provenientes de dichas poblaciones. En las poblaciones naturales se estudió la función de los nectarios extraflorales (NEFs) y la actividad de los visitantes, se colectó

germoplasma para la implementación del cultivo. Previamente a la siembra se realizó el análisis morfológico de las semillas.

En el cultivo, antes de analizar la interacción de los NEFs con sus visitanes, se estudiaron la biología floral, el proceso de germinación, el desarrollo y establecimiento de las plántulas.

Tanto en áreas naturales como en el cultivo se colectó material para realizar el estudio ontogenético de los NEFs, determinar a los visitantes florales y visitantes de los NEFs, así como la carga polínica de los polinizadores.

Análisis preliminar (2008)

Cada especie fue estudiada en las siguientes localidades de su distribución natural:

V. adenantha: CABA, Ciudad universitaria, Buenos Aires.

V. candida: Salta, depto. Capital, Salta.

V. caracalla: Vaqueros, depto. La Caldera, Salta.

V. luteola: Refugio Natural Educativo Rivera Norte, Buenos Aires.

Análisis definitivo (2010-2012)

a) En poblaciones naturales

Durante dos años consecutivos (2010 y 2011) se realizaron observaciones y experimentos de exclusión de hormigas a los NEFs en *V. adenantha* en el Parque

Municipal San Carlos, Concordia, Entre Ríos, Argentina (Figura 1).

Figura 1. Parque San Carlos, Concordia, Entre Ríos, 31°22'14"S 57°59'48"O. Sitio de muestreo de *V. adenantha* durante 2010 y 2011; la flecha indica el área de observaciones.

b) En cultivo experimental

El cultivo se desarrolló durante 2010-2012 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires)

ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, área ecológicamente compatible con las zonas de distribución de las especies y, para *V. adenantha* y *V. luteola* que constituye el extremo sur del área de distribución (Figura 2, A).

Posteriormente (febrero de 2010), las plantas germinadas en el laboratorio a partir del germoplasma colectado fueron transferidas a una parcela alambrada de 10 x 14 metros, donde se distribuyeron en tres hileras de diez plantas por especie, con una separación de un metro entre plantas de una misma hilera y entre hileras (Figura 2, B-D). Cada planta fue transplantada en un pozo de 50 cm profundidad, encañada con 3 cañas atadas entre sí y regada tres veces por semana. El cultivo se desmalezó dos a tres veces por mes, dependiendo de las condiciones meteorológicas y fenológicas. La longevidad de cada especie fue monitoreada hasta el 2012.

Los datos meteorológicos durante todo el

desarrollo experimental fueron obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional (SMN).

Figura 2. Sitio y años de cultivo. A: campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), 34°32'31.4"S 58°26'32.9"O, la flecha indica la ubicación de la parcela. B-D: cultivo en distintas temporadas. B: 2010. C: 2011. D: 2012. Escalas: B = 1,6 m; C= 1,5 m; D = 1,2 m.

Aspectos estudiados y métodos respectivos

Morfología de las semillas y de las plántulas

Caracteres de las semillas

Se realizó un análisis cuantitativo y cualitativo de las semillas antes de destinarlas para la germinación.

Caracteres cuantitativos. La longitud y el ancho de las semillas y del hilo fueron medidos bajo microscopio estereoscópico Nikon SMZ-U, con una escala milimétrica; el espesor fue medido con un calibre Vernier.

Análisis estadístico. Para cada carácter cuantitativo se realizó un ANOVA utilizando el software GraphPad Prism 5.

Caracteres cualitativos. La forma de las semillas, del hilo y la expansión del borde arilar fueron descriptas según Stearn (1973). La coloración fue determinada usando la carta de colores de Kelly (1965).

Para estudiar la superficie de la testa, el hilo y la expansión del borde arilar bajo microscopía electrónica de barrido (MEB), las semillas fueron deshidratadas en una serie creciente de alcohol etílico (50, 60, 70, 80, 90, 100 %), montadas en platinas, cubiertas con oro-paladio y observadas y fotografiadas con un microscopio Zeiss Supra 40 FESEM. Para describir la topografía de la semilla se empleó la terminología de Barthlott *et al.* (1998).

Caracteres de las plántulas

En noviembre de 2009, en el laboratorio, las semillas fueron escarificadas mecánicamente

(realizándose un corte en el tegumento del lado opuesto al hilo) y colocadas en placas de Petri de 15 cm de diámetro preparadas, previamente, con una base de algodón y papel Whatman humedecido con agua destilada. Luego de la germinación, las plántulas fueron transferidas a macetas de 500 mm^3 previamente llenadas con tierra mejorada y perlita 3:1, donde se mantuvieron hasta la aparición de los protófilos. El desarrollo de las plántulas fue registrado desde la germinación hasta la expansión del primer nomófilo (hoja trifoliolada) y hasta que las ramas laterales del eje principal comenzaron a crecer.

Se tomó nota de la emergencia de los cotiledones, el patrón de crecimiento, la longitud del epicótile, el largo y ancho del protófilo (primer y único par de hojas unifolioladas) y el movimiento haptotrópico del hipocótilo y del vástago.

La longitud del epicótile y el largo y ancho del protófilo fueron medidos con una regla milimetrada;

para la forma de los protófilos se siguió la terminología de Stearn (1973). El sistema de ramificación fue descripto después del desarrollo de la primera yema axilar.

Contenido del hipocótilo reservante

Para determinar el tipo de reserva se realizaron cortes a mano alzada del hipocótilo reservante y se tiñeron con lugol y sudán IV.

Biología floral

Se amplió el estudio de la biología floral de *V. adenantha* (Di Stilo *et al.*, 1991) y *V. candida* (Agulló *et al.*, 1993) en esta tesis no se estudió la biología floral de *V. caracalla* ni de *V. luteola* debido a que existen aportes previos (Agulló *et al.*, 1993; Etcheverry, 2005). Sin embargo, durante los estudios

de campo se corroboró la consistencia con las observaciones previas.

Receptividad estigmática y secreción del néctar

La receptividad estigmática se corroboró según Osborn *et al.* (1988), tomándose como positivo el burbujeo de los estigmas expuestos al peróxido de hidrógeno. La secuencia de la antesis fue seguida en líneas generales empleando la metodología de Hoc & Amela García (1998).

Fases florales y visitantes

Las fases florales y los visitantes fueron observados sobre diez flores de diez plantas de cada especie. La identidad, la frecuencia y la actividad de cada visitante floral sobre las flores fueron

registradas durante toda la floración, analizando el régimen de visitas durante la antesis. Se capturaron ejemplares de cada una de las especies de visitantes florales para su posterior identificación taxonómica.

La cantidad de néctar secretado fue colectado y medido con capilares calibrados de 3 µl. Para ello, las flores fueron aisladas con bolsas de voile y el volumen de néctar fue registrado desde el comienzo de la antesis hasta la senescencia floral. La concentración de azúcares totales fue determinada usando un refractómetro de mano.

Sistema reproductivo (experimentos de polinización controlada)

Los siguientes tratamientos fueron realizados sobre capullos seleccionados previamente a la antesis y controlados hasta la senescencia (si no ocurría la

polinización) o hasta la producción de frutos (cuando ésta ocurría). Cuando las flores abrieron, algunas fueron expuestas a los visitantes (polinización libre), otras fueron autopolinizadas manualmente (autogamia inducida) y otras fueron embolsadas (autogamia espontánea). En cada tratamiento el éxito reproductivo fue evaluado usando la siguiente fórmula: (número de semillas/número de óvulos) × 100 (Hoc & Amela García, 1998); el número de óvulos en estas especies es fácil de contar debido a que como tienen posición uniseriada en el carpelo, si ha ocurrido algún aborto es posible cuantificarlo contando los restos en la placenta. Respecto a *V. luteola* y *V. caracalla*, debido a la escasa cantidad de flores disponibles, sólo se realizó el experimento de polinización libre y, en consecuencia, solamente se calculó el éxito reproductivo de este tratamiento.

Atractivos secundarios

El patrón de coloración de las flores fue determinado usando la carta de colores de Kelly (1965). Para determinar la emisión de fragancias y las piezas florales emisoras, se separaron los ciclos florales en diferentes frascos de vidrio herméticos, se los tapó durante 15-20 minutos y a continuación, cada envase fue abierto, detectándose la presencia de olor mediante una prueba olfativa (Kearns & Inouye, 1993).

Análisis de la carga polínica

Para determinar el origen y la variedad polínica que transportaban los visitantes, se seleccionaron las zonas de los insectos donde se depositaban los granos de polen cuando éstos contactaban las flores

utilizando un estereomicroscopio Nikon SMZ-U y se montaron en platinas, se cubrieron con oro-paladio y se observaron y fotografiaron con un microscopio electrónico de barrido Zeiss Supra 40.

Disposición, morfología, anatomía y ontogenia de los nectarios extraflorales

Preparaciones histológicas y observaciones con microscopio óptico (MO)

Las inflorescencias fueron fijadas en FAA y conservadas en etanol 70%. Cada nudo fue seccionado e identificado con un código desde el ápice hasta la base de la inflorescencia siguiendo el protocolo descripto por D'Ambrogio (1986). Cada eje secundario fue deshidratado en una serie ascendente de etanol-xilol e

incluido en parafina y sometido a cortes micrométricos de 10 μm empleando un micrótomo rotativo (Arcano). Los cortes histológicos fueron coloreados con safranina-fast green o violeta de cresilo. Las observaciones y las fotografías fueron realizadas con un microscopio óptico Nikon Labophot.

Observaciones con microscopio electrónico de barrido (MEB)

Cada eje secundario seleccionado y seccionado desde el ápice hasta la base fue deshidratado en una serie ascendente de etanol (70, 80, 90, 100%), sumergido en acetona, sometido a punto crítico, montado en platinas que se cubrieron con oro-paladio, observado y fotografiado con un microscopio electrónico de barrido Zeiss Supra 40.

Observaciones con microscopio electrónico de transmisión (MET)

Cada eje secundario de las inflorescencias se fijó en glutaraldehido al 2,5 %, luego fue sumergido en buffer fosfato durante 24 horas, postfijado en tetróxido de osmio (OsO_4) por 3 horas, deshidratado en una serie creciente de acetona, incluido en resina, sometido a cortes ultramicrométricos de 1 μm, teñido con azul de toluidina al 0,1 %. Una vez seleccionados los cortes a observar, fueron teñidos con acetato de uracilo y citrato de plomo para aumentar el contraste. El material fue observado y fotografiado con un microscopio electrónico de transmisión Jeol-Jem 1200 EXII.

Para la denominación histológica de los NEFs se utilizó el criterio de Fahn (1979).

Análisis de la interacción de los NEFs con insectos visitantes

Se estudió la identidad, la composición y actividad de los visitantes de los NEFs. Con excepción a las observaciones preliminares, se comparó su efecto entre las temporadas de observación para cada especie, tanto en poblaciones naturales como en el cultivo.

Observaciones en el cultivo

El cultivo se recorrió periódicamente, registrando la presencia, identidad taxonómica y actividad de las hormigas, así como de otros visitantes de los NEFs y de los visitantes florales, y de las interacciones entre estos dos grupos de insectos.

Experimentos de exclusión de visitantes de los NEFs

Para determinar la efectividad de la protección por las hormigas se realizaron los siguientes ensayos. Se marcaron y enumeraron inflorescencias elegidas al azar, anotando la cantidad de frutos preexistentes, flores abiertas y capullos.

Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos:

1) Control: se permitió el recorrido normal de los formícidos sobre inflorescencias marcadas con tiras plásticas (Figura 3, A).

2) Exclusión: se excluyeron las hormigas de las inflorescencias. Para ello primero se sacudieron las ramas o se sacaron la hormigas con pincel, se deshicieron los puentes (otras ramas y hojas en contacto con la inflorescencia, por las cuales las hormigas podrían acceder a la inflorescencia en cuestión), se enrolló una pequeña tira de papel de aluminio alrededor del pedúnculo floral, la cual se untó

con una resina repelente de hormigas (Tanglefoot) (Figura 3, B).

Los experimentos se realizaron desde el inicio de la floración hasta el final de la fructificación.

Después de cada tratamiento aplicado, cuando los frutos maduraron se colectaron las inflorescencias marcadas y se guardaron en bolsitas de papel madera. Se contabilizó la cantidad total de frutos y semillas producidas, reconociéndose la cantidad de semillas infestadas y de semillas sanas, y se calcularon los porcentajes respectivos para los dos tratamientos. Los datos se analizaron mediante el software de Di Rienzo *et al*. (2008).

Los resultados obtenidos durante los años de muestreo de las poblaciones de *V. adenantha* en Concordia (Entre Ríos), de *V. luteola* en el cultivo y las comparaciones entre sitios de *V. adenantha* fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal Wallis, debido a que no podía aplicarse un test paramétrico;

no se incluyeron en este análisis el porcentaje de semillas infestadas ya que no se contabilizaron semillas en ese estado para los dos años de muestreo.

Para los resultados del muestreo de *V. adenantha*, y *V. candida* en el cultivo experimental los datos correspondientes al porcentaje de frutos producidos fueron transformados con la función logarítmica antes de realizar el ANOVA, ya que la distribución no cumplía con los supuestos de este test; las demás variables fueron analizadas sin la aplicación de esta transformación.

Figura 3. Experimentos de exclusión de hormigas. A: control. B: exclusión mediante tira de papel aluminio alrededor del pedúnculo impregnada con resina repelente. Escalas: A = 94 mm; B = 63,2 mm.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

MORFOLOGÍA DE LAS SEMILLAS Y LAS PLÁNTULAS

Introducción

La relevancia taxonómica de la morfología y anatomía de las semillas en la familia Leguminosae ha sido señalada por varios investigadores. De Candolle (1825) distinguió el valor sistemático de la curvatura del embrión, separando a la familia Leguminosae en dos grupos, las Curvembriae (embrión curvo) en las que incluyó a la subfamilia Papilionoideae y las Rectembriae (embrión recto), que incluye a la subfamilia Caesalpinioideae y Mimosoideae. Capitaine (1912) diferenció a las tres subfamilias por características morfológicas externas de las semillas. Corner (1951) reforzó el hallazgo de Capitaine (1912) con estudios anatómicos. Recientemente, varios autores demostraron los valores diagnósticos a nivel de género (Kirkbride *et al.*, 2003) y especie (Chernoff *et al.*, 1992; Juan *et al.* 1998; Ubiergo & Lapp, 2007;

Leython & Jâurgui, 2008; Paulino *et al.*, 2010). Las semillas de la subfamilia Papilionoideae fueron descriptas en muchos trabajos. Corner (1951; 1976) analizó la morfología externa seminal reorganizando a la familia Leguminosae; Gunn (1981) diferenció el tipo de arilo existente en las diferentes subfamilias; Chernoff *et al.* (1992) y Azzioui & Es-Sgaouri (1999) estudiaron la ornamentación de la testa y su posible utilización taxonómica. Ubiergo & Lapp (2007) utilizaron los caracteres seminales relacionados con el tamaño, la forma, la posición del hilo y la morfología de los cotiledones para diferenciar géneros. Alsina (1988) y Paulino *et al.* (2010) ampliaron la cantidad de caracteres empleados por Ubiergo & Lapp (2007) y llegaron a diferenciar especies. A pesar de las numerosas contribuciones existentes, solamente las semillas de dos especies de *Vigna* han sido analizadas (Ugborogho & Agomo, 1989; Kirkbride *et al*. 2003), ninguna de las cuales pertenece al Neotrópico.

Las plántulas de las Leguminosae fueron descriptas por varios autores sin referencia explícita a la categoría taxonómica que pertenencían. Compton (1912) relacionó la estructura, el tamaño, la forma, el hábito y la morfología dentro de cada especie. Duke & Polhill (1981) pudieron establecer correlaciones ecológicas y sistemáticas en la familia Leguminosae. Los cotiledones de las Leguminosae pueden variar en la morfología y en la función, así como también en su exposición durante la germinación (Duke & Polhill 1981). Kodama & Sartori (2007) analizaron la coloración, forma e indumento de los cotiledones, así como también la coloración e indumento del hipocótile y la forma de los nomófilos, empleándolos en la clasificación genérica. Rodriguez & Tosí (2007a; 2007b, 2008) analizando el tipo de germinación diferenciaron géneros filogenéticamente muy cercanos. Smith (1981) designó el tipo de venación de los cotiledones y lo relacionó con diferentes tribus

dentro de la subfamilia Papilionoideae. Las plántulas de esta subfamilia pueden pertenecer al tipo *Cinnamomum*, *Chimonanthus* o *Sophora* de acuerdo a Ye (1983). A pesar de estos antecedentes, el conocimiento de la germinación y la morfología de las plántulas en especies de *Vigna* es incompleto. Los caracteres mencionados hasta ahora demuestran que los dos protófilos son unifoliolados y opuestos (Maréchal *et al.* 1978; Ugborogho & Agomo, 1989); además los cotiledones pueden ser hipógeos (germinación criptohipógea, Gunn 1981) o epígeos (germinación faneroepigea, Gunn 1981) (Maréchal *et al.* 1981; Ugborogho & Agomo, 1989).

Beyra & Reyes Artiles (2004) señalaron que unos pocos caracteres pueden ser usados para distinguir las especies dentro del género *Vigna*; ninguno de ellos incluyó a las semillas o a las plántulas en esta diferenciación.

Resultados

Caracteres de las semillas

Caracteres cuantitativos y cualitativos

***V. adenantha*.** Semillas de 5,4-7,9 (6,98 ± 0,62) mm long. x 4,6-5,8 (5,09 ± 0,31) mm de ancho x 2.8-4.9 (3.41 ± 0.46) mm de espesor. Contorno truncado-elíptico (A3), rómbico (C3) o anchamente rómbico (C4) con los vértices redondeados (Figura 1, A). Superficie lisa y opaca, color castaño-oliváceo claro (94) o castaño oliváceo moderado (95). Hilo elíptico (A3), borde arilar con expansión triangular (H3) o anchamente triangular (H4) (Figura 1, A-B; Figura 2, A). Micrópila ubicada en el centro de una depresión de contorno triangular. Estrofíolo de contorno triangular

(H3) o angostamente triangular (H2), de lóbulos poco a nada prominentes (Figura 1, B).

Topografía (MEB): Las células del hilo se disponen de forma laxa en filamentos uniseriados (Figura 2, B). En el borde arilar los túbulos se entrelazan formando una malla espiralada (Figura 2, C). La superficie del tegumento es reticulada con lúmenes cuadrangulares (Figura 2, D).

***V. candida*.** Semillas de 4,7-6,3 (5,90 ± 0,36) mm long. x 2,4-3,0 (2,68 ± 0,12) mm de ancho x 2.1–2.7 (2.43 ± 0.14) mm de espesor. Contorno oblongo (B3), con los vértices ligeramente redondeados (Figura 1, C). Superficie lisa y opaca, color castaño amarillento (76), amarillo anaranjado oscuro (72) o amarillo naranja profundo (69), con pequeñas manchas negras (267). Hilo angostamente elíptico (A2) o angostamente oblongo (B2), borde arilar con expansión anchamente triangular (H4), partida en el ápice (Figura 3, C-D;

Figura 2, E). Micrópila ubicada en el borde de una protuberancia esférica. Estrofíolo sobresaliente, de contorno transversalmente elíptico (A6), poco manifiesto, formando un domo sutil con un surco poco evidente (Figura 1, D).

Topografía (MEB): Las células del hilo son de contorno poliédrico y están densamente dispuestas (Figura 2, F). En la superficie seminal se diferencian túbulos que se expanden y fusionan formando el borde arilar, el cual presenta un patrón reticulado (Figura 2, G). La superficie del tegumento está perforada (lúmenes de 1-2 µm de diámetro) o fosulada (lúmenes de 2 µm long. x 1 µm ancho) (Figura 2, H).

***V. caracalla*.** Semillas de 6,1–7,7 (6,99 ± 0,40) mm long. x 6,1-7,7 (6,68 ± 0,37) mm de ancho x 3,0-4,4 (3,63 ± 0,35) mm de espesor. Contorno transversalmente elíptico (A5) o anchamente oblongo (B4) (Figura 1, E). Superficie lisa y opaca, color

castaño amarillento intenso (75), castaño amarillento oscuro (78), castaño oscuro (59) o castaño rojizo oscuro (44), con manchas color castaño amarillento claro (76), castaño amarillento medio (77), castaño rojizo oscuro (44), anaranjado castaño (54 br O), castaño rojizo intenso (40) o negro (267). Hilo algo hundido, pulvinado, borde arilar con expansión trapezoidal con margen hendido o no (Figura 1, E-F; Figura 2, I). Micrópila inserta en la misma depresión que aloja al hilo. Estrofíolo sobresaliente, obcordiforme (Figura 1, F).

Topografía (MEB): Las células del hilo dispuestas en forma compacta formando filamentos uniseriados (Figura 2, J). En la superficie seminal se diferencian filamentos que dispuestos en forma paralela se fusionan formando el borde arilar (Figura 2, K). La superficie del tegumento es reticulada y granulada (Figura 2, L).

***V. luteola*.** Semillas de 3,3–5,0 (4,42 ± 0,50) mm long. x 3,0-4,9 (3,57 ± 0,44) mm de ancho x 2,3-3,5 (3,02 ± 0,22) mm de espesor. Contorno elíptico (A3), tansversalmente oblongo (B5) o aovado (D3) (Figura 1, G). Superficie lisa y opaca, color negro (267) o castaño amarillo grisáceo oscuro (81 d.gy.y Br). Hilo angostamente elíptico (A2), elíptico (A3), angostamente aovado (D2) o angostamente oblongo (B2), borde arilar sin expansión (Figura 1, G-H; Figura 2, M). Micrópila ubicada sobre un domo, insconspiscua. Estrofíolo sobresaliente, obcordiforme (Figura 1, H).

Topografía (MEB): Las células del hilo están dispuestas formando filamentos moniliformes 1-3 seriados laxamente entrelazados (Figura 2, N). En las proximidades del borde arilar los elementos del retículo se fusionan en patrón estrictamente estriado hacia el borde arilar (Figura 2, O). La superficie del tegumento es reticulado-estriada (Figura 2, P).

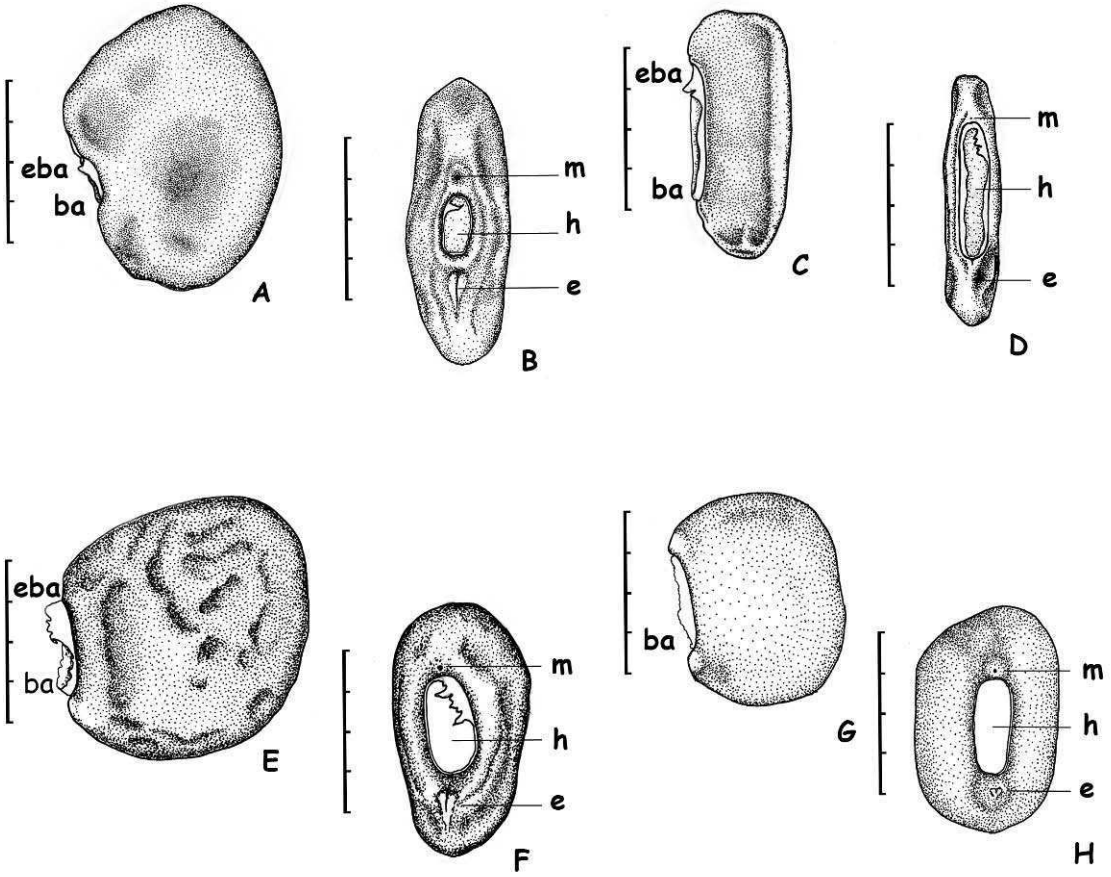


Figura 1. Morfología de las semillas de *Vigna*, observadas con microscopio estereoscópico. A, C, E, G: Vista lateral. B, D, F, H: vista desde el hilo. A-B: *V. adenantha*. C-D: *V. candida*. E-F: *V. caracalla*. G-H: *V. luteola*. Referencias: ba = borde arilar; e = estrofíolo; eba = expansión del borde arilar, h = hilo, m = micrópila. Escalas = 4 mm.

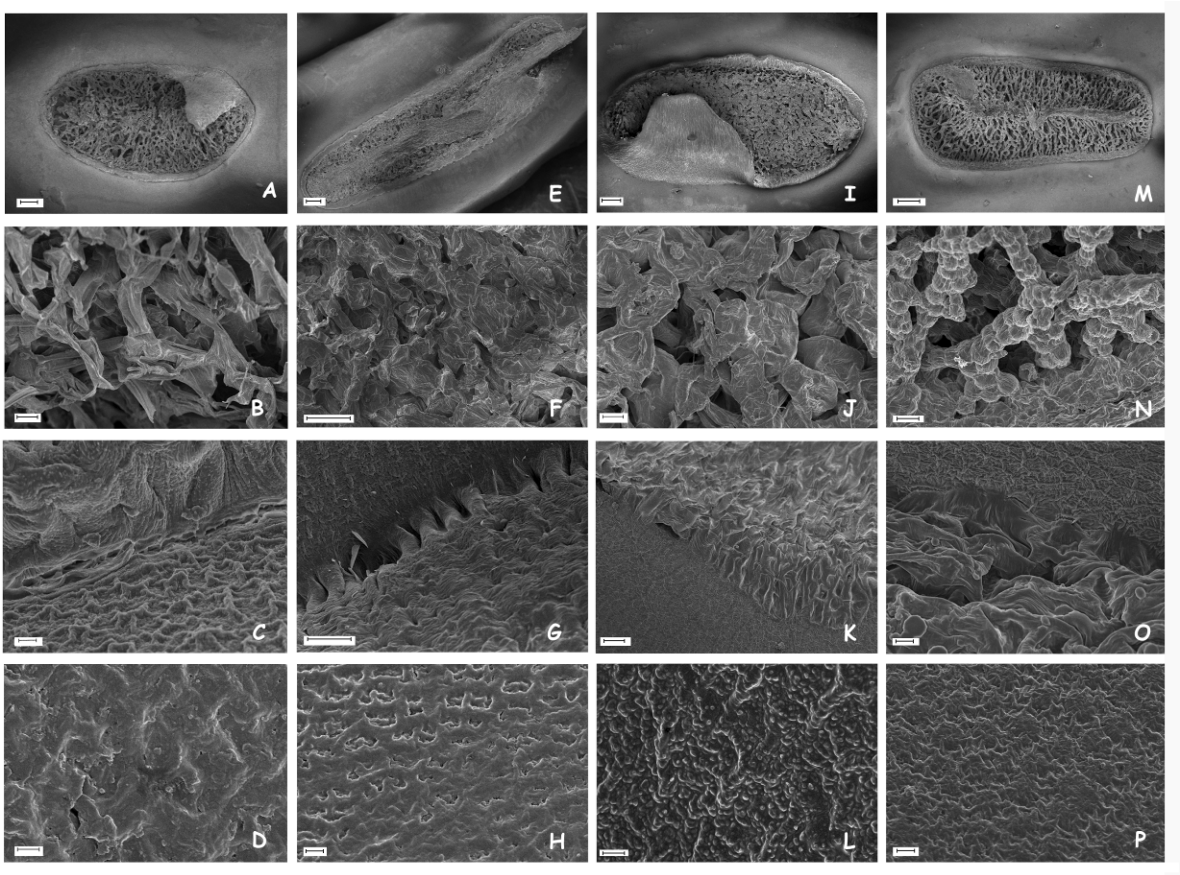


Figura 2. Superficie topográfica de las semillas de *Vigna* vistas con microscopio electrónico de barrido (MEB). A-D: *V. adenantha*. E-H: *V. candida*. I-L: *V. caracalla*. M-P: *V. luteola*. A, E, I, M: hilo y expansión del borde arilar. B, F, J, N: detalle de las células del hilo. C, G, K, O: transición desde la superficie del tegumento hasta la expansión del borde arilar. D, H, L, P: superficie del tegumento. Escalas: A, E, I, M = 100 µm; B, J, N, G, K = 10 µm; F = 30 µm; C, O, H, P = 2 µm; D, L = 1 µm.

Análisis comparativo de los caracteres cuantitativos

Los pares de especies que difirieron en los tres caracteres analizados fueron: *V. adenantha* y *V. candida; V. candida* y *V. caracalla; V. luteola* y *V. candida.* Además, *V. adenantha* y *V. luteola* así como *V. luteola* y *V. caracalla* difieren en el largo y en el ancho, mientras que *V. adenantha* y *V. caracalla* difieren únicamente en el ancho (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA) de los datos de caracteres cuantitativos de las semillas de las cuatro especies de *Vigna* analizadas.

Especies	*V. candida*	*V. caracalla*	*V. luteola*
Largo de las semillas *F* = 65,91			
V. adenantha	8,71*	0,13	16,83*
V. candida		8,84*	8,12*
V. caracalla			16,96*
Ancho de las semillas *F* = 415,9			
V. adenantha	28,82*	18,95*	14,25*
V. candida		47,78*	14,57*
V. caracalla			33,20*
Espesor de las semillas *F* = 63,05			
V. adenantha	14,91*	3,34	3,29
V. candida		18,25*	11,63*
V. caracalla			6,62*

* Difieren significativamente ($p < 0,05$)

Morfología de las plántulas

***V. adenantha*.** Germinación epígea (faneroepígea), con cotiledones carnosos (primero almacenan y posteriormente fotosintetizan) (Figura 3, A), epicótilo de 21-116 (66,17 ± 6,78) mm de largo, protófilos de 18-35 (25,61 ± 4,45) mm de largo x 18-36 (25,80 ± 4,59) mm de ancho, simples, anchamente aovados (D4), con el ápice agudo y la base cordada (Figura 4, A). Con hipocótile grueso y epicótile recto, vástago con movimientos haptotrópicos desde el nudo de los protófilos. El desarrollo de las ramas ocurre a partir de la formación del 15º nomófilo.

***V. candida*.** Germinación epígea (faneroepígea), cotiledones carnosos (Figura 3, B), epicótilo de 21-116 (45,81 ± 4,87) mm long., protófilos 24-38 (30,52 ± 3,54) mm de largo x 16-29 (22,73 ± 3,39) mm de ancho,

simples, triangulares (H3) a anchamente triangulares (H4), con el ápice agudo y la base cordada (Figura 4, B). Con hipótilo grueso y epicótilo recto, vástago con entrenudos acortados entre los protófilos y el 5º-6º nomófilo, con movimientos haptotrópicos desde el 6º nudo. El desarrollo de las ramas ocurre a partir de la producción de los protófilos.

V. caracalla. Germinación hipógea (criptohipógea), cotiledones tróficos (Figura 3, C), epicótilo de 30-83 (37,56 ± 8,84) mm de largo, protófilos de 21-80 (49,37 ± 17,82) mm de largo x 20-55 (37,21 ± 9,78) mm de ancho, simples, aovados (D3), con ápice emarginado y base cortamente atenuada o anchamente triangular (H5) (Figura 4, C). Con hipocótilo grueso y epicótilo recto, vástago con entrenudos cortos entre los protófilos y el 3º nomófilo, con movimientos haptotrópicos desde este nudo, no se ramifica durante el primer año de desarrollo. Ocasionalmente se

observó la existencia de protófilos 2-3-foliolados en vez de protófilos 1-foliados.

***V. luteola*.** Germinación hipógea (criptohipógea), cotiledones tróficos (Figura 3, D), epicótilo 10,1-140 (110,08 ± 5,80) mm de largo, protófilos 17-32 (26,20 ± 3,69) mm de largo x 9-16 (12,17 ± 1,80) mm de ancho, aovados (D3), con ápice agudo y base cortamente atenuada (Figura 4, D). Epicótilo con movimientos haptotrópicos a partir de la producción de los protófilos, vástagos con ramas a partir del 10º nomófilo.

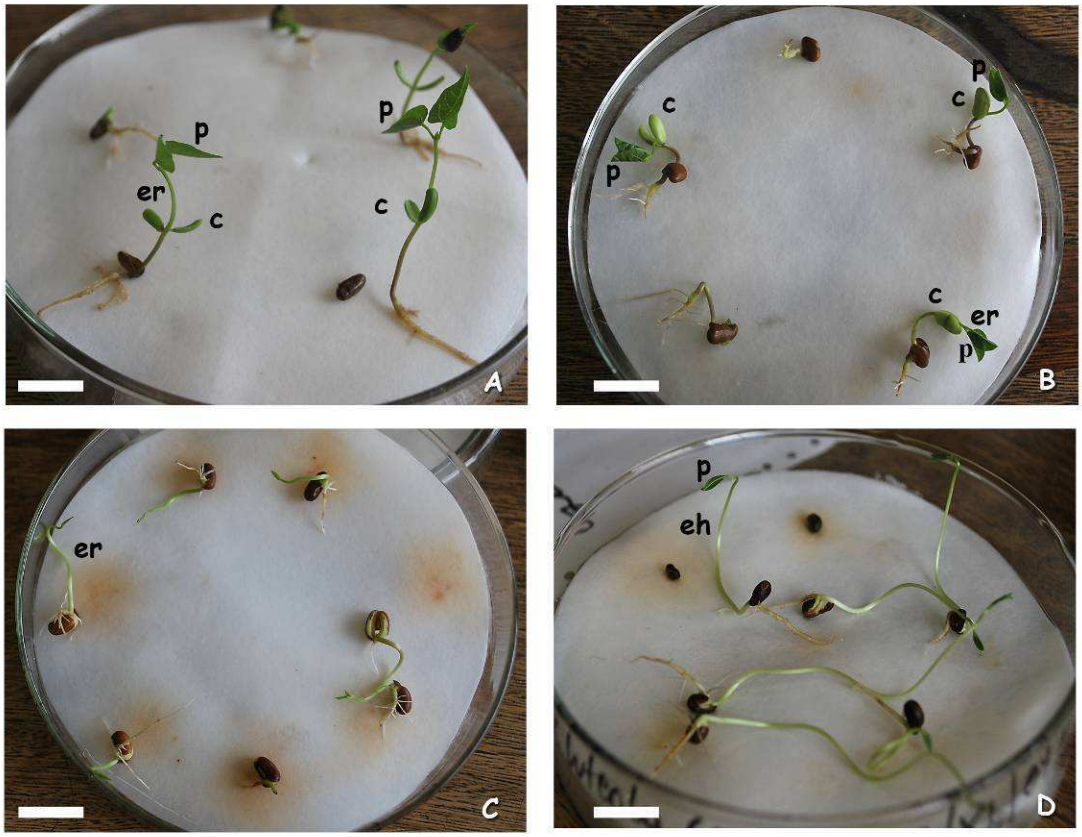


Figura 3. Morfología de las plántulas y tipo de germinación de las especies de *Vigna*. *A*: *V. adenantha.* B: *V. candida.* C: *V. caracalla.* D: *V. luteola*. A-B: geminación epígea. C-D: germinación hipógea. Referencias: c = cotiledones; eh = epicótilo con movimientos haptotrópicos; p = protófilo; er = epicótilo recto. Escalas = 19,1 mm.

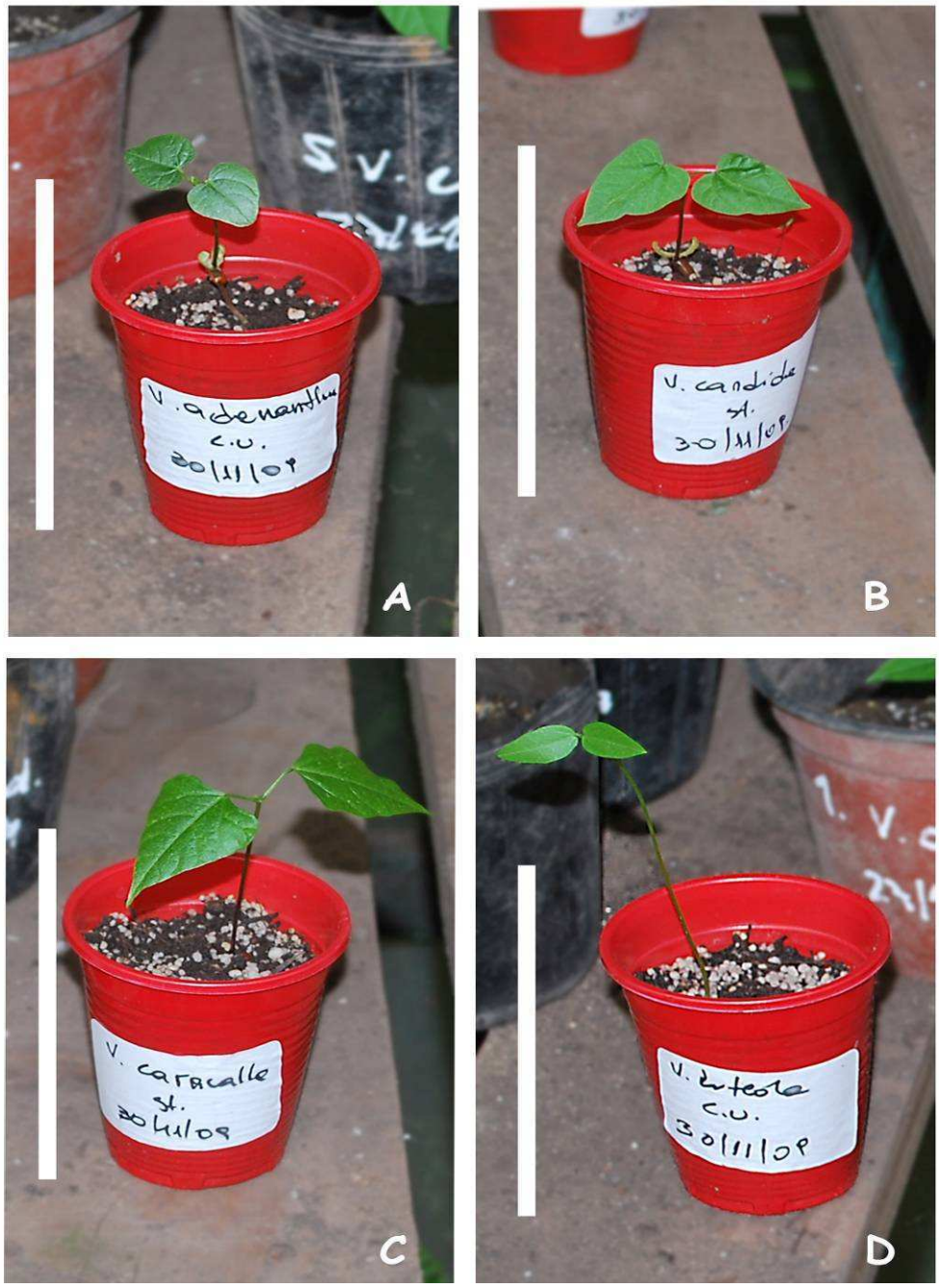


Figura 4. Plántulas con el primer par de hojas opuestas (protófilos), unifolioladas. *A*: *V. adenantha.* B: *V. candida.* C: *V. caracalla*. D: *V. luteola*. Escalas = 78 mm.

Longevidad de las plantas y prosperidad del cultivo

Las cuatro especies prosperaron en el sitio bajo las mismas condiciones meteorológicas desde febrero de 2010 hasta diciembre de 2012 (Tabla 2; Figura 5). *V. adenantha*, *V. candida* y *V. caracalla* resultaron plurianuales, en cambio, *V. luteola* resultó anual y debió ser sembrada cada año.

De las especies perennes, *V. candida* y *V. caracalla* detienen la producción de hojas, llegando esta última a perderlas en su totalidad, mientras la primera permanece verde y con el mismo tamaño hasta la primavera; en *V. adenantha* las hojas se secan, pero permanecen unidas al tallo que en apariencia también se seca. Las tres especies plurianuales poseen hipocótilo reservante (Figura 6); además, *V. adenantha*, a diferencia de las otras dos, es estolonífera y probablemente invasora. El hipocótile reserva exclusivamente almidón, siendo más abundante

en *V. adenantha*, donde además se almacena en el parénquima cortical.

Desde que se inició la floración hasta que finalizó la fructificación fueron dañadas por diferentes insectos. De las cuatro especies, *V. luteola* fue atacada tanto por hormigas cortadoras como por áfidos desde el inicio de la etapa vegetativa hasta el final de la reproductiva. Los áfidos también atacaron a *V. caracalla*, pero no produjeron mayores daños. *V. adenantha* fue la única especie en la que los brúquidos infestaban los frutos y las semillas.

Tabla 2. Condiciones meteorológicas y fenofases durante el cultivo.

AÑOS	MESES / MEDICIONES	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
2010	TM (º C)	29,3	27,1	26,1	21,6	19,1	16,0	14,5	15,1	18,3	20,4	24,5	28,7
	Tm (º C)	21,3	20,6	19,0	14,2	13,0	9,9	8,2	8,9	12,1	13,5	16,4	20,0
	PP (mm)	149,7	286,0	80,7	65,3	121,5	45,7	75,2	27,4	100,0	38,8	43,0	63,3
	Horas de luz (hs)	8,3	5,6	8,2	6,9	4,8	5,8	5,1	6,3	6,1	8,6	9,1	10,2
	Fase vegetativa (Spp)		V. a, V. c, V. ca y V. l	V. a, V. c, V. ca y V. l	V. c y V. ca	V. c y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, y V. ca	V. l y V. ca
	Fase reproductiva (Spp)				V. a y V. l	V. a y V. l						V. c	V. a, y V. c
2011	TM (º C)	29,1	27,4	25,8	22,7	18,2	15,4	14,7	14,5	20,4	21,0	25,9	26,3
	Tm (º C)	21,5	20,4	18,7	15,6	12,1	9,2	7,9	8,7	11,5	13,9	18,7	18,9
	PP (mm)	91,5	111,1	32,7	106,3	34,9	127,1	63,3	17,4	14,0	44,8	52,6	47,2
	Horas de luz (hs)	8,7	9,0	8,8	7,0	6,1	4,2	6,1	4,8	7,9	7,6	9,3	10,3
	Fase vegetativa (Spp)	V. l	V. l				V. a, y V. c,	V. a, V. c y V. ca	V. a, V. c y V. ca	V. a, V. c y V. ca	V. a, V. c y V. ca	V. a, y V. ca	V. ca y V. l

	Fase reproductiva (Spp)	V. a, V. c y V. ca	V. a, V. c y V. ca	V. a, V. c, V. ca y V. l	V. a, V. c, V. ca y V. l	V. a, V. c, V. ca y V. l	V. ca					V. c	V. a y V. c
2012	**TM (º C)**	**29,3**	**28,6**	**25,2**	**21,8**	**19,6**	**15,8**	**13,7**	**16,7**	**19,0**	**21,3**	**26,2**	**28,7**
	Tm (º C)	**21,7**	**20,8**	**18,2**	**14,8**	**14,2**	**8,6**	**6,6**	**11,0**	**12,2**	**15,2**	**18,2**	**20,1**
	PP (mm)	**29,0**	**249,1**	**141,8**	**51,0**	**90,5**	**7,7**	**21,2**	**234,6**	**65,9**	**273,7**	**117,9**	**271,5**
	Horas de luz (hs)	**10,0**	**8,0**	**8,2**	**7,5**	**5,3**	**5,8**	**6,7**	**4,0**	**6,5**	**6,3**	**9,5**	**9,1**
	Fase vegetativa (Spp)	V. l	V. l				V. a, y V. c	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. a, V. c, y V. ca	V. ca
	Fase reproductiva (Spp)	V. a, V. c y V. ca	V. a, V. c y V. ca	V. a, V. c, V. ca y V. l	V. a, V. c, V. ca y V. l	V. a, V. c, V. ca y V. l	V. ca					V. c	V. a y V. c

Abreviaturas: PP = precipitaciones; Tm = temperatura media mínima; TM = Temperatura media máxima; V. a = *V. adenantha*; V. c = *V. candida*; V. ca = *V. caracalla*; V. l = *V. luteola*

Figura 5. Plantas adultas de las cuatro especies de *Vigna* cultivadas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. A: *V. adenantha.* B: *V. candida.* C: *V. caracalla*. D: *V. luteola*. Escalas: A = 1.2 m; B = 1,3 m; C = 1,5 m; D = 1,6 m.

Figura 6. Hipocótilo reservante de las tres especies plurianuales de *Vigna* cultivadas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. A: *V. adenantha.* B: *V. candida*. C: *V. caracalla*. Escalas = 29,5 cm.

Clave para diferenciar a las especies

Todos los caracteres observados tanto para las semillas como para las plántulas así como también la longevidad permitieron la diferenciación entre especies, y, como resultado, la elaboración de la siguiente clave que podría ser útil para usos agronómicos u ornamentales.

1. Patrón de crecimiento anual, sin hipocótilo reservante, epicótilo con movimientos haptotrópicos. Semillas sin expansión del borde arilar. Superficie

del tegumento reticulado-estriada …… ***V. luteola*** **(Sect. *Vigna*).**

1'. Patrón de crecimiento plurianual, con hipocótilo reservante, epicótilo recto, sin movimientos haptotrópicos. Semillas con expansión del borde arilar. La superficie del tegumento no es reticulado-estriada …….**2**

2. Semillas 2,4-3,0 (2,68 ± 0,12) mm de ancho x 2,1-2,7 (2,43 ± 0,14) mm de espesor, oblongas. Vástago recto, con entrenudos acortados entre los protófilos y los 5°-6º nomófilos. Movimientos haptotrópicos a partir del 6° nudo. El desarrollo de las ramas ocurre desde la formación de los protófilos. La superficie del tegumento es perforado-fosulada …….***V. candida*** **(Sect. *Sigmoidotropis*).**

2'. Semillas más anchas que 2,4-3,0 mm y de espesor mayor a 2,1-2,7 mm, truncada-elípticas, rhomboidales o ampliamente romboidales, con vértice redondeado, transversalmente elíptico o ampliamente oblongo. Vástago con movimientos haptotrópicos a partir del nudo correspondiente a los protófilos o al

3º nomófilo. El desarrollo de las ramas se produce a partir del 15º nudo, o no ocurre la ramificación. La superficie del tegumento no es perforada-fosulada …….**3**

3. Semillas de 4,6-5,8 (5,09 ± 0,31) mm de ancho, superficie sin puntos coloreados. Hilo elíptico, borde arilar con expansión triangular o anchamente triangular. Germinación faneroepígea. Vástago con movimientos haptotrópicos a partir del nudo correspondiente a los protófilos. El desarrollo de las ramas ocurre a partir del 15º nomófilo. Protófilos cordados en la base. Superficie del tegumento reticulada, lúmina sin gránulos …….***V. adenantha* (Sect. *Leptospron*).**

3'. Semillas de 6,1-7,7 (6,68 ± 0,37) mm de ancho, superficie con puntos coloreados. Hilo sumergido y protegido, borde arilar con expansión trapezoidal con o sin márgenes hendidos. Germinación criptohipógea. Vástago recto, con entrenudos cortos entre los protófilos y el 3º nomófilo, con movimientos haptotrópicos a partir de este nudo, no

se ramifica hasta el primer año de desarrollo. Protófilo cortamente atenuados o ampliamente triangulares hasta la base. Superficie del tegumento reticulada, lúmina con gránulos …….*V. caracalla* **(Sect.** *Caracallae***)**.

CAPÍTULO II

BIOLOGÍA FLORAL Y SISTEMA REPRODUCTIVO

Introducción

La asimetría floral presente en el género *Vigna* se asocia al tipo de polinización melitófila en el cual intervienen himenópteros de mediano a gran porte (Faegri & Van der Pijl, 1979), aunque también se han observado avispas y mariposas visitando *V. minima* (Gopinathan & Babu, 1987). Los polinizadores más efectivos en algunas especies de *Vigna* fueron especies de *Xylocopa* presentes en *V. vexillata* (Hedström & Thulin, 1986), *V. caracalla* (Etcheverry, 2005; Etcheverry *et al.*, 2008) especies de *Megachile* en *V. longifolia* (Hoc *et al.*, 1993) y *V. luteola* (Agulló *et al.*, 1993). El mecanismo de transferencia polínica puede ser nototriba (Hedström & Thulin, 1986; Di Stilio *et al.*, 1991; Hoc *et al.*, 1993; Etcheverry, 2005; Etcheverry *et al.*, 2008) pleurotriba o esternotriba (Gopinathan & Babu, 1987; Agulló *et al.*, 1993), dependiendo de la morfología floral de la especie de *Vigna* en cuestión

serían *V. unguiculata*, *V. caracalla* y *V. minima* autógamas según Vaz *et al.* (1998), Etcheverry *et al.* (2008), Gopinathan & Babu (1987) siendo esta última, hasta el presente, la única especie que posee polimorfismo floral (Gopinathan & Babu, 1987).

Es posible asumir con base en estudios preliminares que las especies aquí estudiadas son melitófilas polinizadas por himenópteros de mediano gran porte; sin embargo, no se ha estudiado a muchas de ellas en forma exhaustiva. En la actualidad los datos más completos con que se cuentan sobre la biología floral dentro del género *Vigna* abarcan a las especies paleotropicales (Hedström & Thulin, 1986; Kumar, 1976; Gopinathan & Babu, 1987); mientras que, a excepción *V. caracalla* (Etcheverry, 2005, Etcheverry *et al.*, 2008), el conocimiento de las neotropicales, especialmente las nativas de Argentina, es parcial (Di Stilio *et al.*, 1991; Hoc *et al.*, 1993; Agulló *et al.*, 1993).

Dado que las especies bajo estudio podrían presentar un importante potencial como forrajeras y/u ornamentales en áreas ecológicamente compatibles a las de su distribución natural, es necesario conocer el éxito reproductivo de las mismas.

Resultados

Características comunes de *V. adenantha* y *V. candida*

La antesis comienza aproximadamente a las 8:00 a. m. y finaliza a las 5:00 p. m. del mismo día; la finalización ocurre más temprano si el lote bajo estudio no está iluminado directamente por el sol. La antesis comprende dos fases florales (1 y 2), detalladas más abajo.

El mecanismo de transferencia y recepción polínica es del tipo papilionado-pistón (Faegri & van der Pijl, 1979) el que admite más de una visita de polinizadores durante la fase 1, siendo la transferencia nototriba o pleurotriba. El atractivo primario es el néctar, oculto en la base del ovario y secretado por un nectario anular. El polen es presentado en forma secundaria por los tricomas estilares. Tanto las alas como el estandarte constituyen el atractivo secundario, debido al color, y, en *V. candida*, además debido al olor emitido.

Los Himenópteros polinizadores son ápidos de mediano o gran tamaño (*Xylocopa* spp., *Bombus* sp. *Centris* sp.).

En los tratamientos de autopolinización espontánea se observó que, aunque no ocurriera la fecundación, las flores alcanzaban la fase 2 de la antesis, luego se marchitaban y caían.

Una vez que las flores alcanzan la fase 2, si se realiza una presión sobre el ala (izquierda en *V. adenantha* y derecha en *V. candida*), tanto el estigma

como el cepillo estilar se exponen, pero las piezas florales no recuperan su posición original.

Durante la fase 2 y, de mediar la polinización, el estigma ya no es receptivo, no hay secreción de néctar, pero aún hay polen presentado en los tricomas estilares; si bien éste puede ser removido, los visitantes legítimos evitan estas flores.

Se han detectado además hurtadores o ladrones de néctar (*Ptiloglossa* sp. y Halictidae).

Atractivos y estadios florales

V. adenantha

Las flores son erectas, del tipo estructural papilionoidea (flag-blossom) según la clasificación de Faegri & van der Pijl (1979).

En la fase 1 de la antesis (Figura 1, A), el estandarte cuculado y unguiculado, tiene el margen recurvado. El limbo del estandarte es blanco (263)

en el centro, y púrpura muy pálido (226) hacia los márgenes; entre el limbo y la uña hay guías de néctar amarillo- verdoso intenso (116). El limbo de las alas es blanco (263) con bandas purpúreas (218) a rojizo intenso (239); ambas alas están adnatas a la quilla por medio de las uñas de éstas (las papilas epidérmicas de ambas piezas contribuyen a esta unión). La quilla es blanca; su ápice está girado 540º (un giro y medio) hacia la izquierda. En este momento las anteras están dehiscentes, el polen se presenta secundariamente en los pelos del cepillo estilar, por debajo del estigma, este último comienza a estar receptivo. Se inicia la secreción del néctar.

En la fase 2 de la antesis (Figura 1, B), el limbo del estandarte se pliega cubriendo el resto de la flor y su coloración vira al amarillo intenso (83). Algunas partes de las alas también toman esta coloración, pero las bandas se vuelven gris púrpura (253).

Durante toda la antesis en las flores no se detectó olor perceptible por el ser humano.

V. candida

En la primera fase de la antesis (Figura 1, c), el estandarte es cuculado y unguiculado, con su margen recurvado; el limbo es blanco (263) en el centro y violeta intenso (206) hacia los márgenes; entre el limbo y la uña hay guías de néctar amarillo verdoso brillantes (98). El limbo de las alas es blanco (263) con bandas longitudinales originándose desde el centro que es color violeta oscuro (207). Ambas alas están adnatas a la quilla por medio de las uñas. La quilla es blanca (263) y sigmoidea con una torsión hacia la derecha. En este momento, las anteras están dehiscentes y el polen se presenta en los pelos del cepillo estilar; el estigma comienza a estar receptivo. Se inicia la secreción del néctar en el disco nectarífero que rodea la base del ovario.

Durante la fase 2 de la antesis (Figura 1, D), el estandarte pliega sus márgenes hacia las alas y toma coloración amarillo-naranja moderado (71). El limbo de las alas toma un color naranja-amarillento (71), mientras que las bandas de la quilla adquieren una coloración púrpura - rojizo profundo (238).

Durante toda la antesis las flores emiten un profundo olor cítrico.

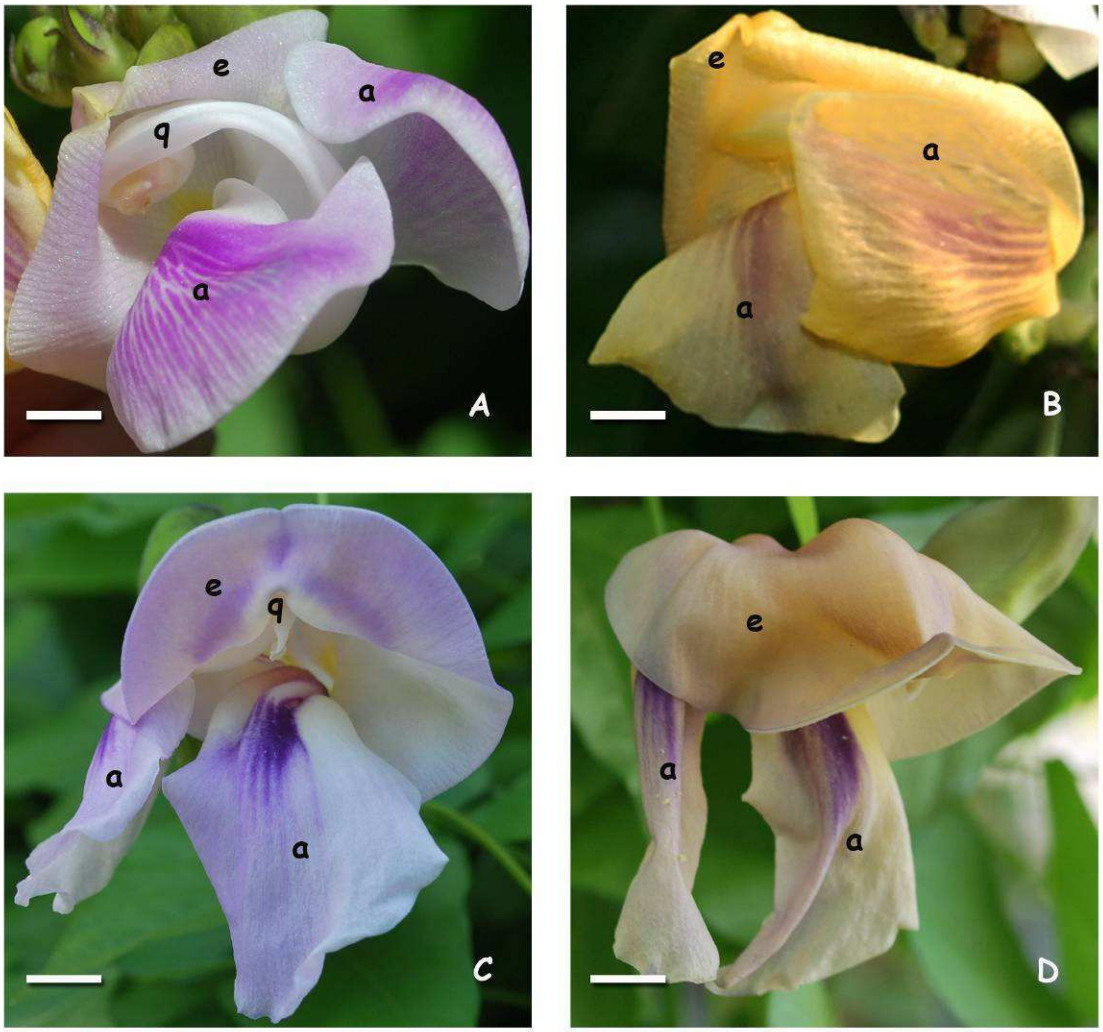


Figura 1. Etapas de la antesis. A-B: *V. adenantha*. C-D: *V. candida*. A, C: fase 1. B, D: fase 2. Abreviaturas: a, alas; e, estandarte; q, quilla. Escalas: A, C = 5,1 mm; B = 5,7 mm; D = 5,8 mm.

Néctar

V. adenantha

El volumen secretado fue de 1,84 ± 1,25 µl (n = 10) durante la antesis y el porcentaje de azúcares totales fue de 41 ± 8 % (n = 10).

V. candida

El volumen secretado fue de 2,37 ± 2,04 µl (n = 10) durante la antesis y el porcentaje de azúcar registrado fue de 46 ± 10 % (n = 10).

Visitantes

Siguiendo el criterio de Roig Alsina (2008a) y Roig Alsina (2008b), todos los visitantes registrados fueron himenópteros incluidos en Apidae, excepto *Ptiloglossa*, que pertenece a Colletidae y representantes de Megachilidae y Halictidae.

V. adenantha

Taxa registrados y su actividad en las flores

Las visitas a las flores comenzaban a partir de las 8:00 a. m. y cesaban cuando el manchón en estudio estaba sombreado. Individuos de *Xylocopa augusti* (Figura 2, A-H), *Centris* sp. (Figura 2, I-L) y, más raramente, *Bombus atratus* (Fig. 2, M-N), libaban el néctar acumulado en la base del ovario posándose sobre el ala izquierda, presionándola hacia abajo con sus patas anteriores e introduciendo

la lengua en el tubo estaminal (Figura 2, A-N). De esta manera, la quilla era empujada hacia abajo y, tanto el estigma como el cepillo estilar, sobresalían de la quilla tocando el costado derecho del mesopronoto y/o la primer ala derecha del visitante (Figura 2, E-H, J-L). Cuando el visitante se marchaba de la flor, el ala izquierda y la quilla retomaban la posición original (Figura 2, B). Las visitas duraban aproximadamente dos segundos por flor.

Los visitantes que no accionaban el mecanismo de transferencia y recepción polínica fueron *Apis mellifera* (Figura 1, O) y *Trigona* sp. (Figura 1, P). Individuos de *A. mellifera* visitaban las flores succionando el néctar sin contactar las anteras. Los de *Trigona* sp. estaban presentes en las flores desde las 12:30 hasta las 4:30 p. m.; estos visitantes se posaban sobre las guías de néctar del ala izquierda y caminaban hacia la quilla, donde hurtaban polen.

Polen transportado

X. augusti: El polen de *V. adenantha*, era transferido al sector dorsal derecho del tórax y a las alas del mismo lado. Eventualmente se observó polen de Labiatae e *Ipomoea* (Convolvulaceae) y *Passiflora* (Passifloraceae) en el sector dorsal izquierdo del tórax en el límite con la cabeza. Como resultado del proceso de limpieza que realizaban los individuos, parte del polen era transferido al tercer par de patas (Figura 3, A-C).

Centris sp.: acarreaban sobre el sector central del tórax polen de *V. adenantha*, ocacionalmente *Acanthaceae* y *Solanaceae* (Figura 3, D-E). Como resultado del proceso de limpieza que realizaban los individuos, parte del polen era transferido al tercer par de patas (Figura 3, F- G).

Figura 2. Visitantes de *V. adenantha*. A-N: polinizadores. O-P: hurtadores. A-H: *X. augusti*. I-L: *Centris* sp. M-N: *B. atratus*. O: *A. mellifera* llegando a la inflorescencia y *X. Augusti* visitando una flor en fase 1. P: *Trigona* sp. Escalas: A = 16,4 mm; B = 17,4 mm; C = 20,3 mm; D = 21 mm; E = 12,8 mm; F = 13 mm; G = 9,3 mm; H = 12,9 mm; I = 19,3 mm; J = 15,2 mm; K = 10,6 mm; L, M = 12,1 mm; N = 11,3 mm; O = 13,3 mm; P = 8,7 mm.

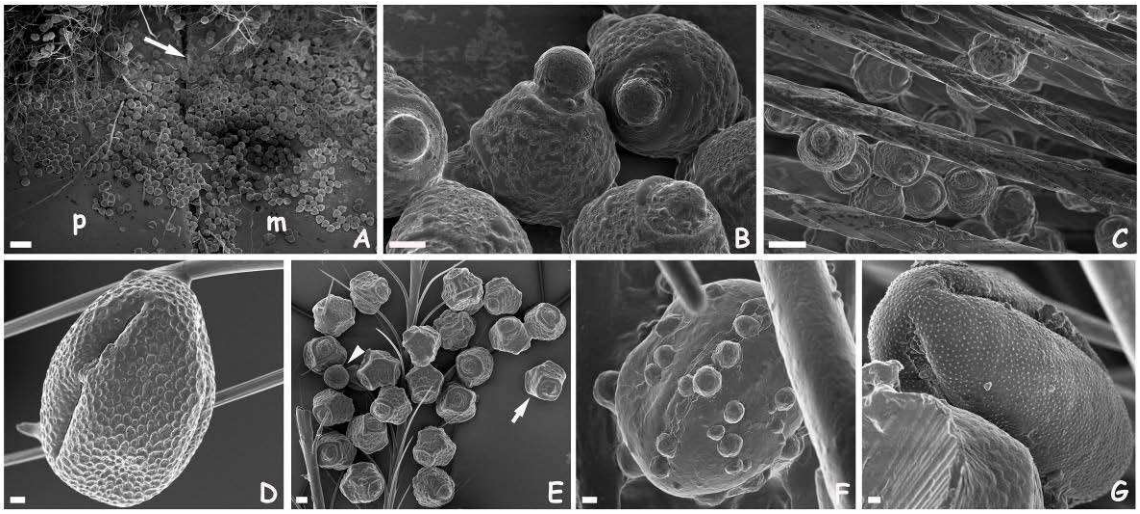


Figura 3. Polen transportado por *X. augusti* (A-C) y *Centris* (D-G). A-C: polen de *V. adenantha*. A: polen depositado en el protórax (p) y el mesotórax (m); la flecha indica la línea de división entre ambos. B: detalle de los granos de polen. C: granos retenidos por los pelos del tercer par de patas. D, E: granos depositados en el tórax. D: detalle del grano de *Poikilacanthus turedianus* (Acanthaceae). E: granos de *V. adenantha* (flecha) y *Siphonoglossa* (Acanthaceae) (punta de flecha). F, G: granos depositados en el tercer par de patas. F: grano de *Stenandrium* (Acanthaceae). G: detalle de un grano de Solanaceae. Escalas: A = 100 µm; B = 10 µm; C = 30 µm; D-F = 2 µm; E = 10 µm; G = 1 µm.

V. candida

Taxa registrados y su actividad en las flores

Las visitas a las flores comenzaban a partir de las 8:00 a. m. y cesaban a las 5:00 p. m., o más

temprano cuando el manchón estaba sombreado. *X. augusti* (Figura 4, A-B), *B. atratus* (Fig. 4, C-D), *Centris* sp. Y *Ptiloglossa* sp. (Figura 4, E), libaban el néctar acumulado en la base del ovario posándose en el ala derecha, presionándola hacia abajo con sus patas anteriores e introduciendo la lengua en el tubo estaminal. En ese momento, la quilla era forzada a descender, y tanto el estigma como el cepillo estilar quedaban expuestos, tocando el lado derecho del dorso del tórax del insecto visitante; cuando éste se marchaba, el ala derecha y la quilla retomaban su posición original.

Ocasionalmente se observaron algunos individuos de *B. atratus* posándose sobre el ala izquierda de la flor, succionando el néctar sin accionar el mecanismo de transferencia del polen, actuando en estos casos como hurtadores de néctar.

Entre los visitantes ilegítimos, se pudieron observar individuos de *A. mellifera* y Euglossinae. Los individuos de *A. mellifera* (Figura 4, F) succionaban el néctar posándose sobre el cáliz, el

cual había sido previamente perforado por algún individuo de Euglossinae (ladrón primario de néctar), siendo entonces hurtadores secundarios de néctar.

Polen transportado

X. augusti: El polen de *V. candida* era transferido al sector dorsal izquierdo del tórax y las alas del mismo lado, eventualmente al sector central del tórax, donde además se registró polen de *Passiflora* y Solanaceae. Como proceso de limpieza se detectó polen de *V. candida*, *Passiflora* y Solanaceae en el tercer par de patas (Figura 5, A-B).

Figura 4. Visitantes de *V. candida*. A-E: polinizadores. F: hurtadores. A-B: *X. augusti*. C-D: B. atratus. E: *Ptiloglossa* sp. F: *A. mellifera.* Escalas: A = 11,2 mm; B = 11,8 mm; C = 9,1 mm; D = 11,4 mm; E = 10,9 mm; F = 8,6 mm.

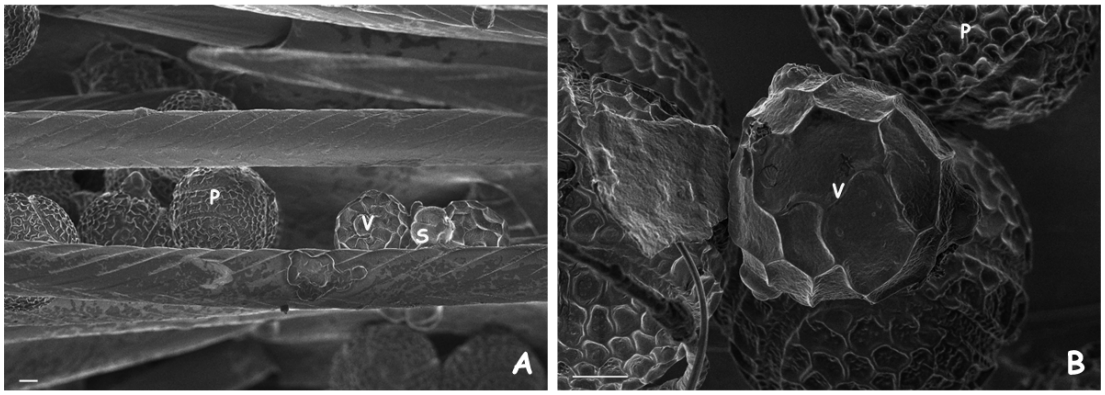


Figura 5. Polen transportado por *X. augusti*. A: polen de *V. candida* (V), *P. caerulea* (P) y *Solanum bonariensis* (S) retenido entre los pelos del tercer par de patas. B) Polen de *V. candida* (V) y *Passiflora caerulea* (P) depositado en la zona dorsal del tórax. Escalas = 10 µm.

Sistema reproductivo

V. adenantha

Si bien en todos los tratamientos la fructificación fue efectiva, se observó una mayor producción de semillas por autogamia inducida (Tabla 1).

V. candida

De los tres tratamientos, el único efectivo fue el de polinización libre (Tabla 1).

V. caracalla

Únicamente se analizó la polinización libre y, en consecuencia, solamente se calculó el éxito reproductivo de este tratamiento debido a la escasa cantidad de flores disponibles, obteniéndose un alto éxito (Tabla 1).

V. luteola

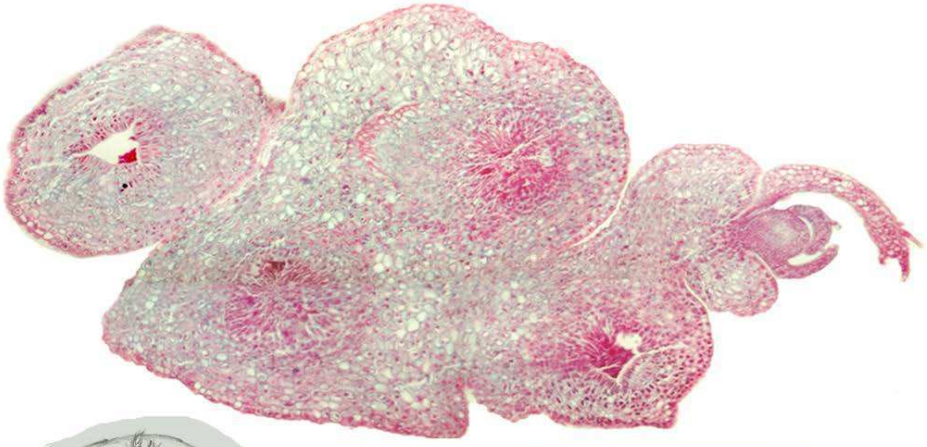
Debido a la escasa cantidad de flores disponibles únicamente se analizó la polinización libre y, en consecuencia, solamente se calculó el éxito reproductivo de este tratamiento, obteniéndose un alto éxito (Tabla 1).

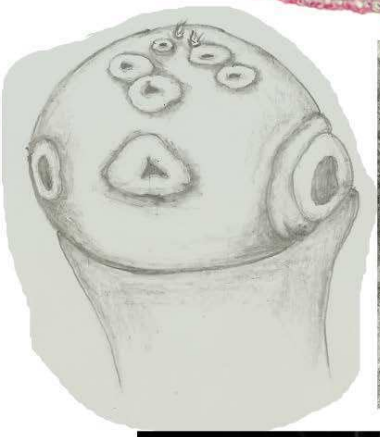
Se observó a las abejas del género Megachilidae recortando las hojas.

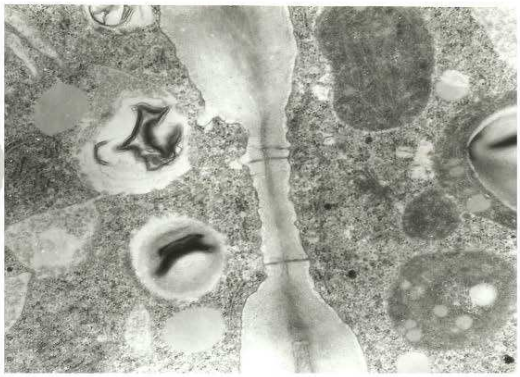
Tabla 1. Éxito Reproductivo Relativo (ERR)

Especie	Nº de flores tratadas	Nº de semillas	Nº de óvulos	ERR
Polinización libre				
V. adenantha	54	2.320	4.294	54
V. candida	190	2.473	3.122	79
V. caracalla	48	601	904	66
V. luteola	10	248	346	72
Autogamia inducida				
V. adenantha	5	48	54	89
V. candida	10	0	0	0
Autogamia espontánea				
V. adenantha	10	20	194	10
V. candida	10	0	0	0

CAPÍTULO III







DISPOSICIÓN, MORFOLOGÍA, ANATOMÍA Y ONTOGENIA DE LOS NEFs

Introducción

Las investigaciones realizadas hasta el presente señalan que en el género *Vigna* Savi, las inflorescencias son racimos en cuyos nudos generalmente se desarrollan de una a tres flores, así como de uno a más NEFs (Ojehomon, 1968). Estas estructuras tienen valor taxonómico y permiten distinguir a *Vigna* de *Phaseolus* L. (McKey, 1989).

Los estudios acerca de los NEFs de diferentes familias de Leguminoseae involucran la morfología (Machado *et al*., 2008; Melo *et al*., 2010), la anatomía (Francino *et al*., 2006; Melo *et al*., 2010), la ultraestructura (Fahn, 1987; Durkee *et al*., 1999) y la ontogenia (Ojehomon, 1968; Tucker, 1987; 2003; Sousa Paiva & Rodriguez Machado, 2010). Algunos aspectos, tales como la vascularización, no han recibido mucha atención (Ojehomon, 1968; Kuo & Pate, 1985; Nepi, 2007).

La ontogenia de las flores y las inflorescencias de las Leguminosae fueron investigadas en muchos representantes de la familia (Tucker, 1984; Tucker, 2003), especialmente en algunas Mimosoideae (Ramirez-Domenéch & Tucker, 1988), en muchas Caesalpinieae (Kantz & Tucker, 1994) y en algunas Papilionoideae (Tucker, 1989; Tucker and Stirton, 1991), en ellas la única aproximación al estudio del desarrollo floral de *Vigna* involucra a una única especie, *Vigna unguiculata* (L.) G. W. Walpers (Ojehomon, 1968; Ahmed *et al*., 1992, 1993).

A partir de algunos de estos estudios se demuestra que los NEFs asociados a las inflorescencias en las Leguminosae se originan a partir de primordios florales abortivos (Ojehomon, 1968; Tucker, 1987; 2003), especialmente en las Papilionoideae (Ojehomon, 1968; Tucker, 1987; Díaz Castelazo *et al.*, 2005). En algunos de ellos, no sólo cuando los capullos abortan, sino también cuando se caen las flores (Díaz Castelazo *et al.*, 2005).

Ojehomon (1968) estudió la ontogenia de los NEFs de *V. unguiculata* y, posteriormente, Kuo & Pate (1985) examinaron la anatomía durante su período de secreción, pero no analizaron la ontogenia, no existiendo otros datos sobre el desarrollo de los NEFs en *Vigna*.

Los estudios embriológicos en las especies de *Vigna* abarcan únicamente a *V. unguiculata*, donde se analizó la formación del óvulo y el desarrollo del embrión en los frutos persistentes y abortivos (Ojega & Samyaolu, 1970, citado en Faigón Soverna et al., 2003; Ojehomon & Samyaolu; 1970) y a *V. adenantha*, donde se examinaron el óvulo y los granos de polen, en el contexto de un análisis comparativo del complejo *Vigna-Phaseolus-Macroptilium* (Benth.) Urb. (Faigón Soverna, 2002; Faigón Soverna *et al.*, 2003). No existe aporte alguno en el que se relacione el desarrollo ontogenético de los NEFs con la embriogénesis de las flores presentes en el mismo eje secundario.

Resultados

Morfología general de las inflorescencias

En cada nudo de las inflorescencias se origina un eje secundario portador de una o más flores opuestas y de 2 o más NEFs (Figura 1, A-P). La cantidad de nudos, la forma del eje secundario y la cantidad de NEFs varía entre especies.

V. adenantha: la inflorescencia tiene hasta 9 o más nudos, en cada uno de los cuales se origina un eje secundario aovado (Figura 1, D), que porta 2 flores y de 4 a 7 NEFs (Figura 1, A-D). Los nectarios presentes en cada nudo del raquis secundario están densamente dispuestos, de modo que su disposición es aparentemente alterna debido a la compresión del raquis secundario y a la cantidad de NEFs generados en el mismo (Figura 1, C-D).

V. candida: la inflorescencia posee 4 o más nudos, cada uno portador de un eje secundario aovado (Figura 1, H), el cual lleva de 1 a 2 flores y de 5 a 9 NEFs (Figura 1, E-H). Los nectarios están densamente dispuestos y aparentemente alternos debido a la compresión del raquis secundario y a la cantidad de NEFs generados en el mismo (Figura 1, H).

V. caracalla: la inflorescencia tiene 5 o más nudos, en cada uno de los cuales se origina un eje secundario esférico (Figura 1, L) portador de 2 a 3 flores y de 6 a 8 NEFs (Figura 1, I-L). Los NEFs se presentan densamente dispuestos aparentemente en forma alterna debido a la compresión del raquis secundario y a la cantidad de NEFs generados en el mismo (Figura 1, L). Cabe mencionar que la aparición de 2 o tres flores no ocurre en todos los ejes secundarios sino en forma azarosa.

V. luteola: la inflorescencia posee 6 nudos, cada uno de los cuales lleva un eje secundario oblongo (Figura 1, P), en el cual se desarrollan 2 flores y de 2 a 3 NEFs (Figura 1, M-P) dispuestos en línea recta (Figura 1, P), de los cuales sólo uno es funcional.

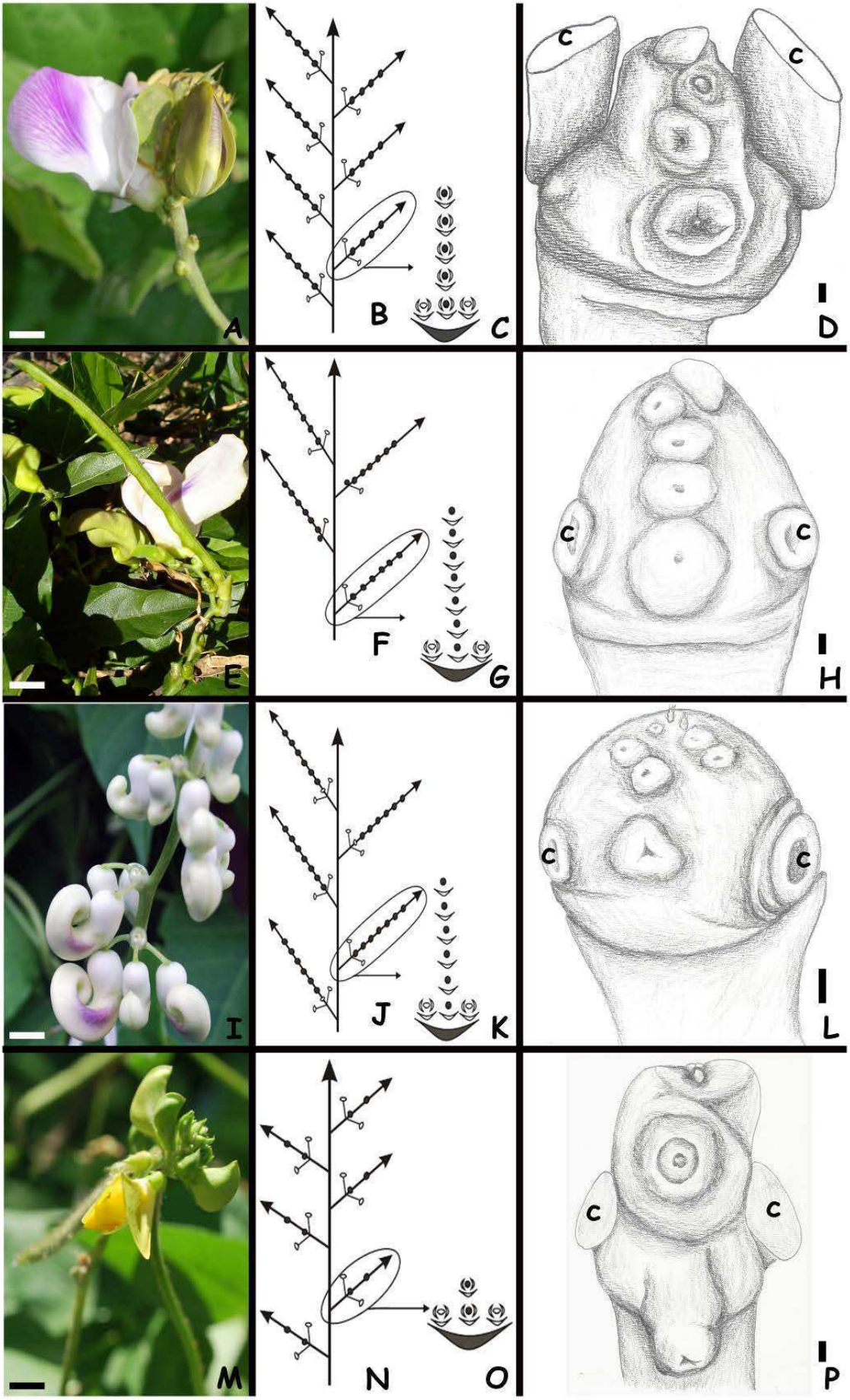

A
B
C
c
c
D
E
F
G
c
c
H
I
J
K
c
c
L
M
N
O
c
c
P

Figura 1. Morfología general de los NEFs de las cuatro especies de *Vigna* analizadas. A-D: *V. Adenantha.* E-H: *V. candida*. I-L: *V. caracalla.* M-P: *V. luteola*. A, E, I, M: vista general de la inflorescencia. B, F, J, N: esquema de la inflorescencia. C, G, K, O: representación esquemática de un eje secundario; los círculos blancos corresponden a las flores y los negros a los NEFs. D, H, L, P: dibujo del eje secundario con detalles de los NEFs (las flores fueron removidas) c, cicatriz de la inserción del pedicelo. Escalas: A = 7,5 mm; D, H, P = 0,03 mm; E = 16,4 mm; I = 9,5 mm; L barra = 0,05 mm; M = 5,1 mm.

Morfología y anatomía de los NEFs

Cada nectario es sésil, consiste de un grupo de células centrales rodeadas por un anillo (Figura 2, A-D); las células centrales a menudo son alargadas longitudinalmente asemejándose a papilas (células papilosas) (Figura 4, E) y por debajo de ellas hay tejido parenquimático, mientras el anillo está formado por células epidérmicas y parenquimáticas subyacentes (Figura 3, E; Figura 7, C; Figura 10, B; Figura 13, D).

En *V. adenantha*, el anillo puede tomar tanto la forma de dona (Figura 2, A, cabeza de flecha) como la de media luna (Figura 2, A, flecha).

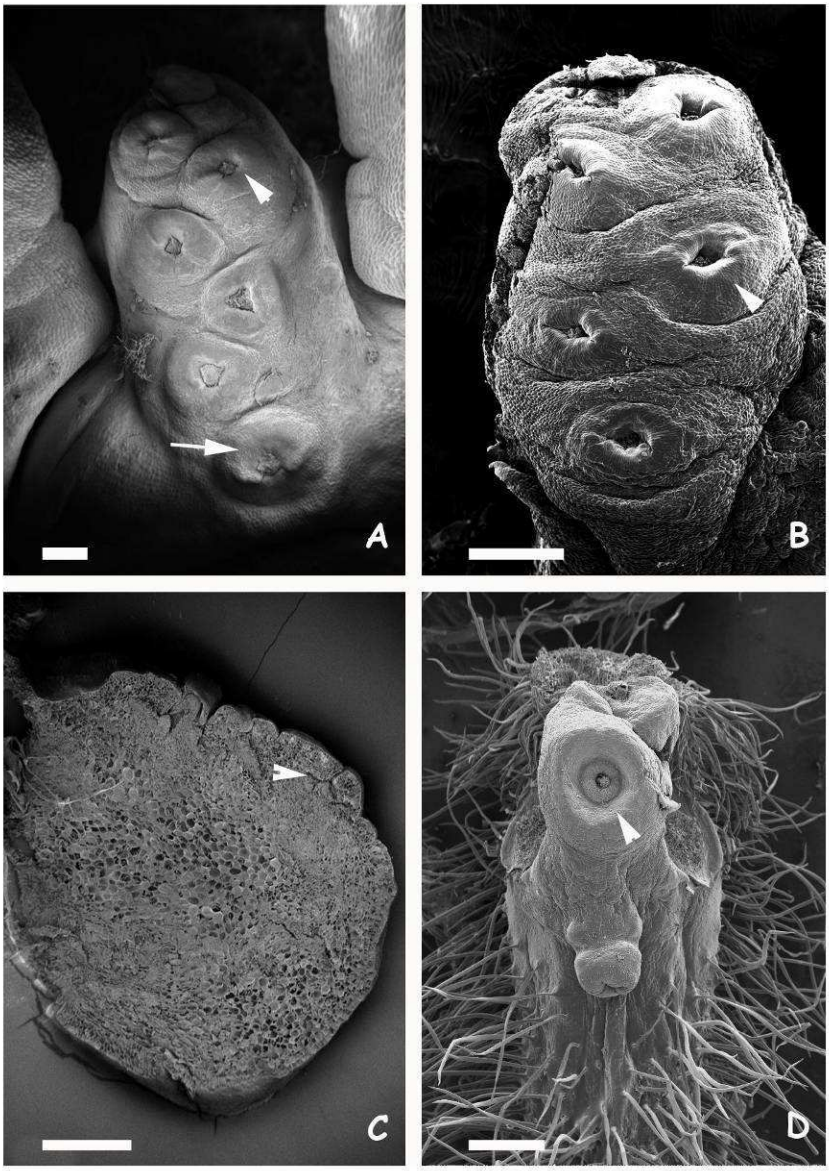


Figura 2. Vista de los nudos portadores de NEFs. A, B, D: vistas generales. C: corte longitudinal. A: *V. adenantha.* B: *V. candida.* C: *V. caracalla*. D: *V. luteola*. Las cabezas de flechas señalan Los nectarios con su forma anular característica; en *V. adenantha* la flecha indica el nectario en forma de media luna. Escalas: A, C = 100 µm; B = 600 µm; D = 500 µm.

Ontogenia de los nectarios extraflorales

Para cada especie se pudieron distinguir cuatro estadios de desarrollo.

V. adenantha

Estadio 1. Se forma una pequeña protuberancia hemisférica en la axila de la bráctea tectriz; este meristema está constituido por una protodermis y una región subyacente (Figura 3, A). La bráctea posee tricomas simples y glandulares pluricelulares en la cara abaxial (Figura 4, A). Debajo de esta protuberancia que posteriormente devendrá en una yema floral se pueden observar las bandas procambiales (Figura 3, A) y al lado, sobre el lado opuesto a la inserción de la bráctea tectriz, el tejido subepidérmico comienza a proliferar, formando otra protuberancia, la cual, exomorfológicamente, aparece como el inicio de una

formación anular formada por protodermis y varias capas de células subyacentes (Figura 3, B).

Estadio 2. La bráctea tectriz se desprende y sobre el eje de la yema floral ya diferenciada se forman dos bracteolas (Figura 3, B); ambas son pilosas en su cara abaxial, poseen tricomas simples y glandulares pluricelulares (Figura 3, B; Figura 4, B). En el ápice meristemático de la yema floral se inician dos primordios de sépalos (Figura 3, B; Figura 4, C). En la base de la yema floral se puede distinguir una banda de células con contenido altamente denso y bastante ancha, la cual podría corresponder a la futura zona de abscisión (Figura 3, B). Debajo de esta zona hay células alargadas longitudinalmente, con una pared primaria delgada. El anillo ahora está totalmente diferenciado, con la epidermis cubierta con una fina cutícula y las células parenquimáticas subyacentes sin espacios intercelulares, altamente vacuolizadas y con núcleos conspicuos (Figura 3, B); esta estructura se desarrolla a partir de las células

que forman el eje secundario de la inflorescencia, no del primordio floral (Figura 4, C).

Estadio 3. En la base de la yema floral la vascularización está representada por floema y xilema (Figuras 3, C-D). La yema floral no continúa su desarrollo y cae junto con las bracteolas, a través de la zona de abscisión, dejando expuestas las células centrales (Figura 3, E-F, Figura 4, D-E), longitudinalmente alargadas, cuyas paredes, parcialmente degradadas exhiben perforaciones (Figura 4, F). Debajo de estas papilas hay tejido parenquimático (Figura 3, E). Dicho tejido se tiñe fuertemente con safranina-fast green (Figura 3, E) y toluidina (Figura 3, F). Con ambos colorantes, se observa un contenido profundamente teñido entre las células centrales, que corresponderían a la secreción de néctar (Figura 3, E-F). La cutícula de las células epidérmicas del anillo se adelgaza progresivamente (Figura 3, F) y estas células aparecen teñidas intensamente con los colorantes

mencionados (Figura 3, E-F). Las células parenquimáticas subyascentes del anillo tienen vacuolas conspicuas con contenido que también se tiñe intensamente con safranina-fast green (Figura 3, E) y toluidina (Figura 3, F). Este constituye el estadio secretor.

Estadio 4. La secreción del néctar cesa, las células centrales degeneran (Figura 4, G), y aumenta la vacuolización tanto de las células del anillo como del parénquima subyacente de las células centrales.

Ultrastructura del estadio secretor (estadio 3)

Anillo. Las células de la epidermis exhiben una pared tangencial externa muy gruesa (Figura 5, A), atravesada por notorios ectodesmos (Figura 5, B), algunos de ellos cargados con un contenido altamente electrondenso o con vesículas en su interior (Figura 5, A-B). Las laminillas medias de las paredes radiales aparecen distendidas y entre ellas pueden

observarse cavidades (Figura 5, A). Un contenido de electrodensidad equivalente se acumula en la pared tangencial externa, por fuera de ésta (Figura 5, B) y entre las invaginaciones de la plasmalema y la pared (Figura 5, C-D). Las células parenquimáticas subyacentes presentan vacuolas con contenido fibrilar de variada electrodensidad, REr, numerosos ribosomas libres, dictiosomas, abundantes amiloplastos con uno a varios gránulos de almidón y glóbulos lipídicos (Figura 5, D-E). Estas células parenquimáticas están conectadas por muchos plasmodesmos (Figura 5, F).

Células centrales. Las células papilosas presentan citoplasma con numerosos ribosomas libres, abundantes mitocondrias y dictiosomas (Figura 6, A-B). Las células parenquimáticas subyacentes exhiben vacuolas con contenido medianamente electrodenso, amiloplastos, plástidos que contienen gránulos de almidón y glóbulos lipídicos, mitocondrias y REr (Figura 6, C-D). Las células parenquimáticas están

comunicadas entre sí por plasmodesmos (Figura 6, D).

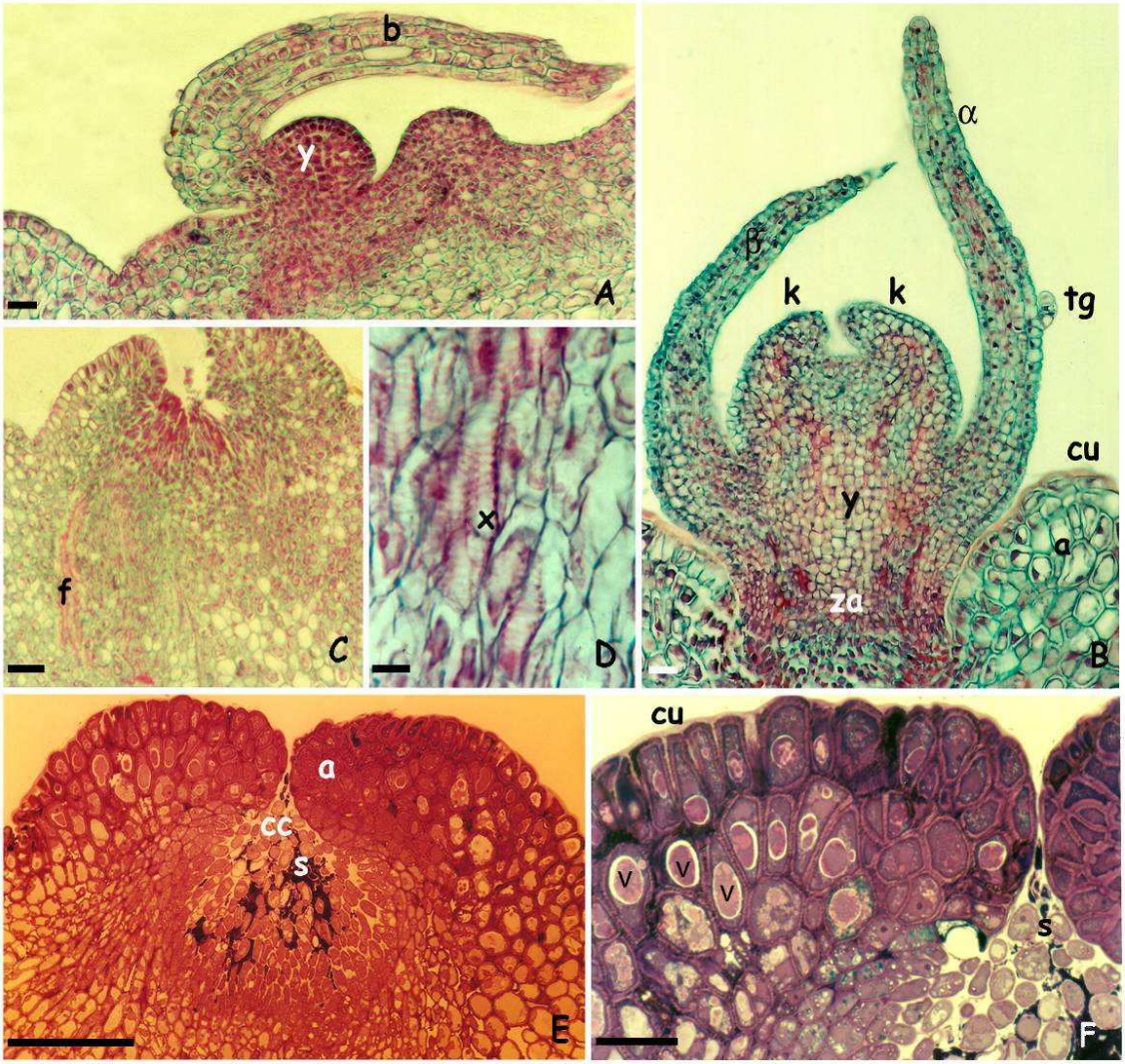


Figura 3. Microscopía óptico de la ontogenia de los NEFs de *V. adenantha* en corte longitudinal. A: estadio 1: bráctea tectriz (b) protegiendo una yema floral (y). B: estadio 2: anillo (a) cubierto con cutícula (cu), bractéolas (α y β) con tricomas glandulares (tg) que protegen la yema floral en la cual se desarrollan 2 lóbulos de cáliz (k), por debajo de ésta se halla la zona de abscisión (za). C, D: zona basal de un NEF. C: floema (f). D: xilema (x). E-F: estadio 3. E: tinción con safranina-fast green: anillo, células centrales (cc) y secreción (s). F: tinción con azul de toluidina: anillo con células

epidérmicas cubiertas por la cutícula, adelgazada, células parenquimáticas con vacuolas (v) y secreción (s) entre las células centrales. Escalas: A, B = 4 µm; C, D = 5 µm; E = 100 µm; F = 40 µm.

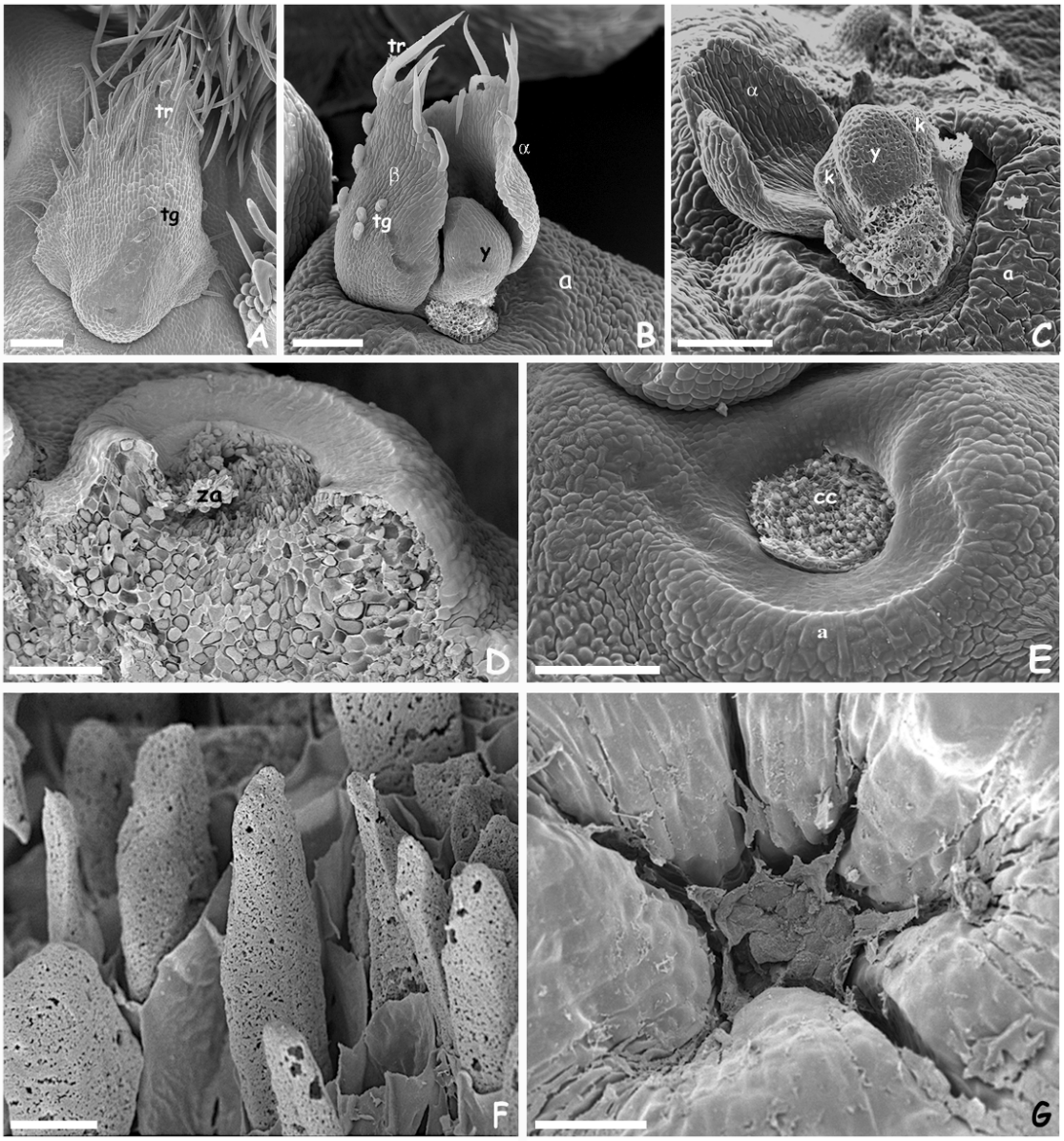


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de los NEFs de *V. adenantha*. A-B: estadio 1. A: bráctea tectriz con tricomas unicelulares (tr) y tricomas glandulares (tg). B: bráctea tectriz removida, se observan las bractéolas α-β con tricomas unicelulares y glandulares, la yema floral (y) y el anillo (a). C: estadio 2: bractéola β removida, yema floral con los lóbulos del cáliz (k) y el anillo. D-E:

estadio 3. D: sección longitudinal de un NEF con restos de la zona de abscisión (za). E: depresión por caída de la yema floral mostrando un anillo en forma de media luna y las células centrales (cc). F: células centrales elongadas con parte de la pared degradada. G: estadio 4: células centrales completamente degradadas. Escalas: A = 120 µm; B, C, E = 100 µm; D = 80 µm; F = 4 µm; G = 40 µm.

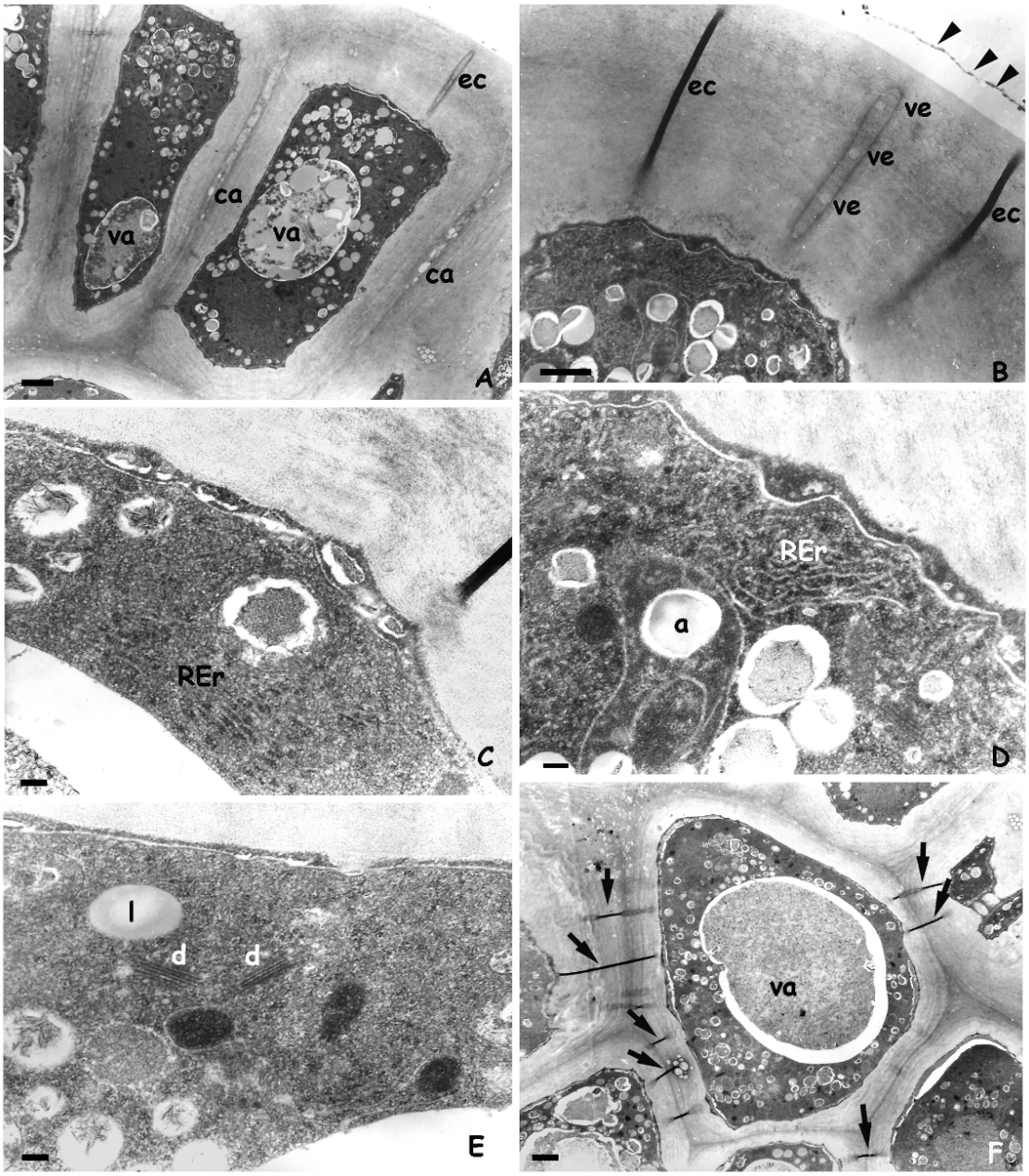


Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión del estadio secretor de los NEFs de *V. adenantha* (anillo). A-B: células epidérmicas. A: vista general

de las células con vacuolas (va), ectodesmos (ec) y cavidades (ca) en la laminilla media. B: detalle de la membrana celular con invaginaciones, ectodesmos con contenido altamente electrondenso y vesículas (ve) dentro, y secreción altamente electrondensa sobre la pared externa tangencial (puntas de flechas). C-F: células parenquimáticas subyacentes. C: invaginaciones de la plasmalema y cisternas del retículo endoplasmático rugoso (REr). D: REr y amiloplastos (a). E: dictiosomas (d) y glóbulos lipídicos (l). F: Plasmodesmos (flechas) conectando células adyacentes. Escalas: A, F = 2 µm; B = 1 µm; C-E = 0,2 µm.

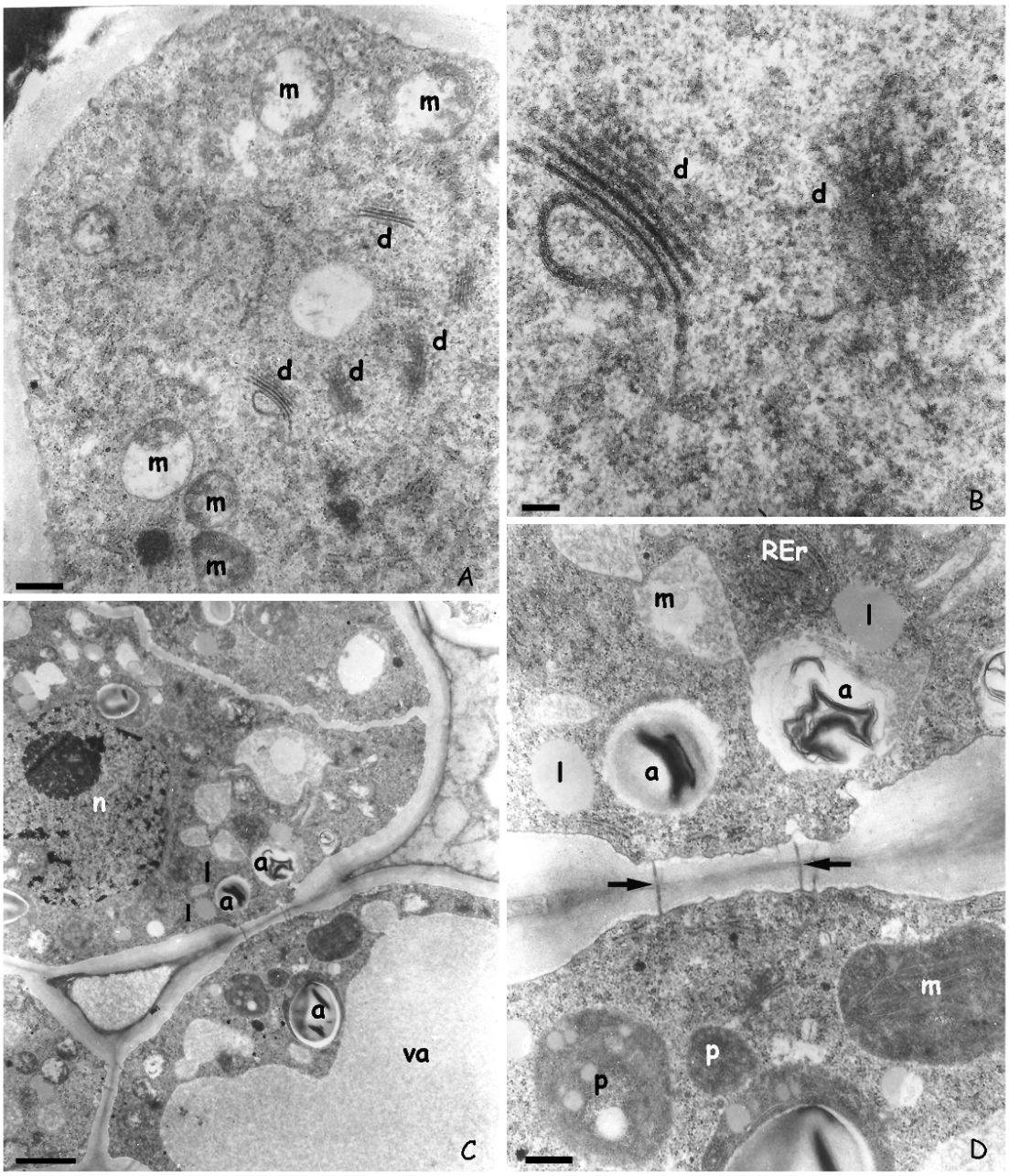


Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión del estadio secretor de los NEFs de *V. adenantha* (células centrales). A-B: células papilosas. A: dictiosomas (d) y mitocondrias (m). B: detalle de A, enfocado sobre dictiosomas y ribosomas libres. C-D: células parenquimáticas. C: amiloplastos (a) y vacuola (va). D: detalle de C, señalando amiloplastos, glóbulos lipídicos (l), plástidos y plasmodesmos (flechas). Escalas: A, D = 0,5 µm; B = 0,1 µm; C = 2 µm.

V. candida

Estadio 1. Se inicia una pequeña protuberancia hemisférica, constituida por protodermis la cual protege las células subyacentes (Figura 7, A). Esta estructura está completamente cubierta por una bráctea que tiene tricomas pluricelulares en su cara abaxial (Figura 8, A). Debajo de la protuberancia que posteriormente devendrá en yema floral se pueden observar las bandas procambiales (Figura 7, A) y del lado opuesto a la inserción de la bráctea tectriz, el tejido subepidérmico comienza a proliferar formando otra protuberancia, la cual, exomorfológicamente, aparece como el inicio de una formación anular constituida por una protodermis y varias capas de células meristemáticas parenquimáticas.

Estadio 2: Debajo de la bráctea tectriz, en el ápice meristemático de la yema floral ya diferenciada, comienzan a desarrollarse dos lóbulos de sépalos

(Figura 7, B). Debajo de esta zona, hay muchas capas de células parenquimáticas esféricas o poliédricas y pueden observarse las bandas procambiales llegando a la yema floral (Figura 7, B). El anillo está totalmente diferenciado, con una epidermis y un parénquima subyacente sin espacios intercelulares (Figura 7, B); esta estructura se desarrolla a partir de las células del eje secundario de la inflorescencia, no de la yema floral.

Estadio 3. La yema floral no continúa su desarrollo y se cae, junto con la bráctea tectriz, persistiendo una zona de abscisión que durante el transcurso de este estadio se desprende, dejando expuestas las células centrales papilosas que se tiñen intensamente con violeta de cresilo, se observa un parénquima subyacente (Figura 7, C). Las células epidérmicas y parenquimáticas subyacentes del anillo presentan también una fuerte tinción con violeta de cresilo (Figura 7, C). Este constituye el estadio secretor.

Estadio 4. La secreción del néctar cesa las células centrales degeneran y aumenta la vacuolización tanto de las células del anillo como del parénquima subyacente de las células centrales (Figura 7, D; Figura 8, B-C). La vascularización se encuentra representada por el floema y el xilema, haciéndose evidente en las células centrales y el parenquima subyacente (Figura 7, D).

Ultrastructura del estadio secretor (estadio 3)

Anillo. Las células epidérmicas exhiben una pared homogénea de moderada electrondensidad y partículas dispuestas entre ellas y la cutícula, que presentan la misma electrondensidad que aquellas contenidas en la gran vacuola central; el citosol contiene entre células, numerosos ribosomas libres, dictiosomas y vesículas en exocitosis hacia fuera de la pared tangencial externa (Figura 9, A-B). Las células parenquimática tienen glóbulos lipídicos, mitocondrias, ribosomas libres y cloroplastos

confinados contra las paredes radiales por la gran vacuola central con contenido electrondenso; existen vesículas en exocitosis, algunas de ellas se encuentran en estrecho contacto con los dictiosomas (Figura 9, C-D).

Células centrales. Las paredes radiales de estas células exhiben laminillas medias parcialmente degradadas, hay abundante secreción por fuera de la pared tangencial externa y pequeñas vacuolas, algunas de las cuales tienen contenido de la misma electrondensidad que la secreción en el exterior (Figura 9, E). Hay numerosas mitocondrias, dictiosomas, ribosomas libres y pequeñas vacuolas con contenido que por su electrondensidad indicarían acumulación de almidón (Figura 9, F). La pared de estas células presenta invaginaciones y se observa secreción acumulada entre ésta y la cutícula, además de la depositada sobre la cutícula (Figura 9, F).

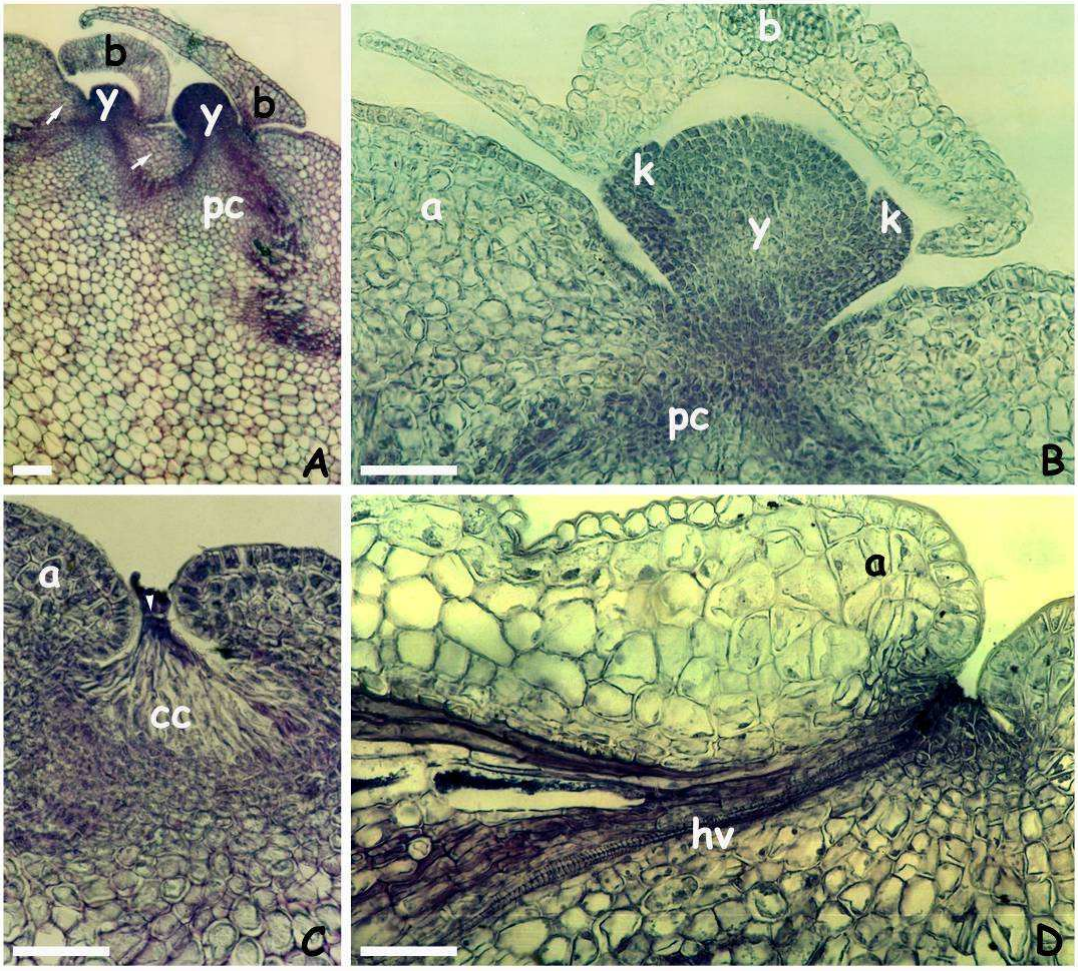


Figura 7. Microscopía óptico de la ontogenia de los NEFs de *V. candida*. A: estadio 1: bráctea tectriz (b), yema floral (y), procambium (pc) y el anillo incipiente (flechas). B: estadio 2: bráctea tectriz, yema floral con dos lóbulos del cáliz (k), anillo y el tejido procambial por debajo de la yema. C: estadio 3: la yema floral se ha caído, anillo completamente formado, células centrales (cc) y zona de abscisión (cabeza de flecha). D: estadio 4: las células del anillo y las subyacentes a las centrales aumentan su vacuolización, haces vaculares (hv) bien diferenciados. Escalas: A = 4 µm; B-D = 10 µm.

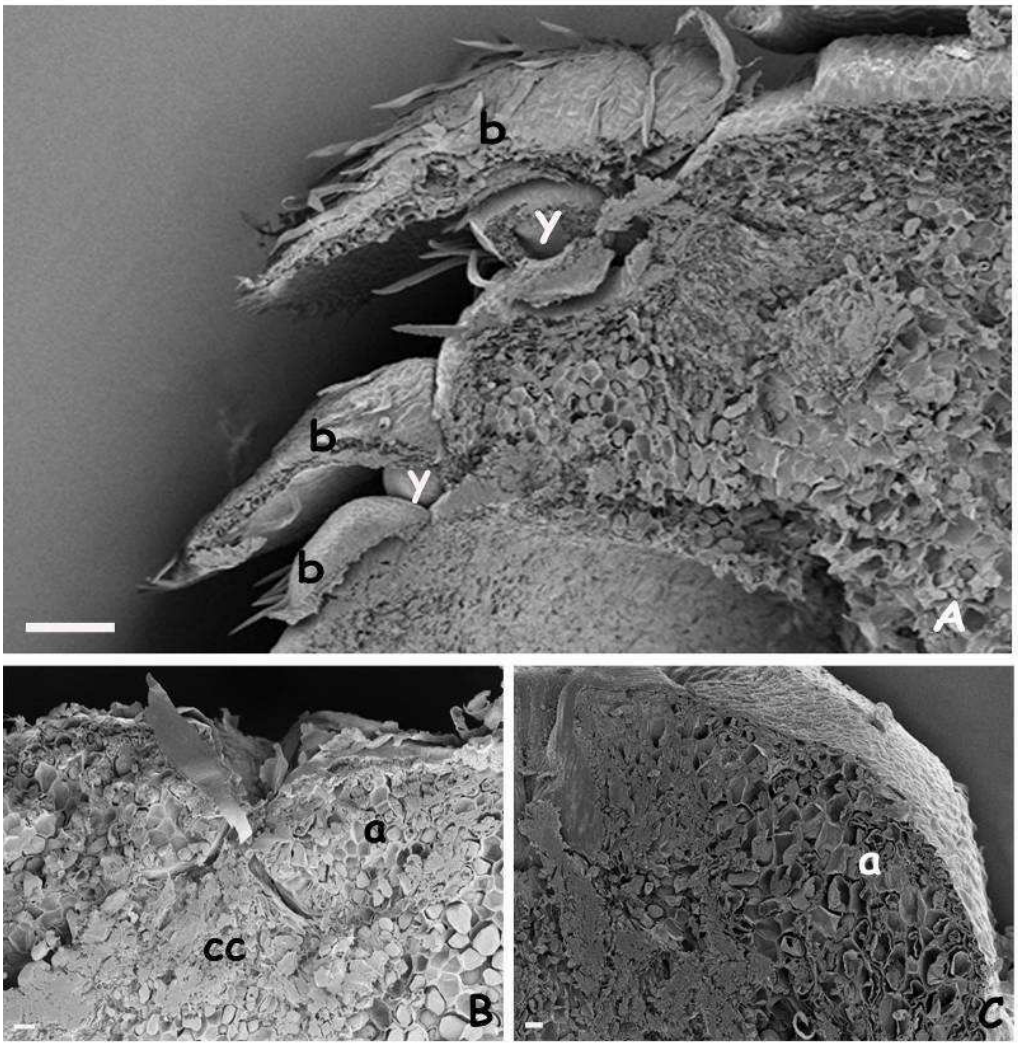


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido de los NEFs de *V. candida*. Cortes longitudinales. A: estadio 1: tres brácteas tectrices (b) cubriendo las yemas florales (y). B–C: estadio 4. B: anillo (a) y células centrales (cc) degradadas C: células del anillo altamente vacuolizadas. Escalas: A = 100 µm; B-C = 20 µm.

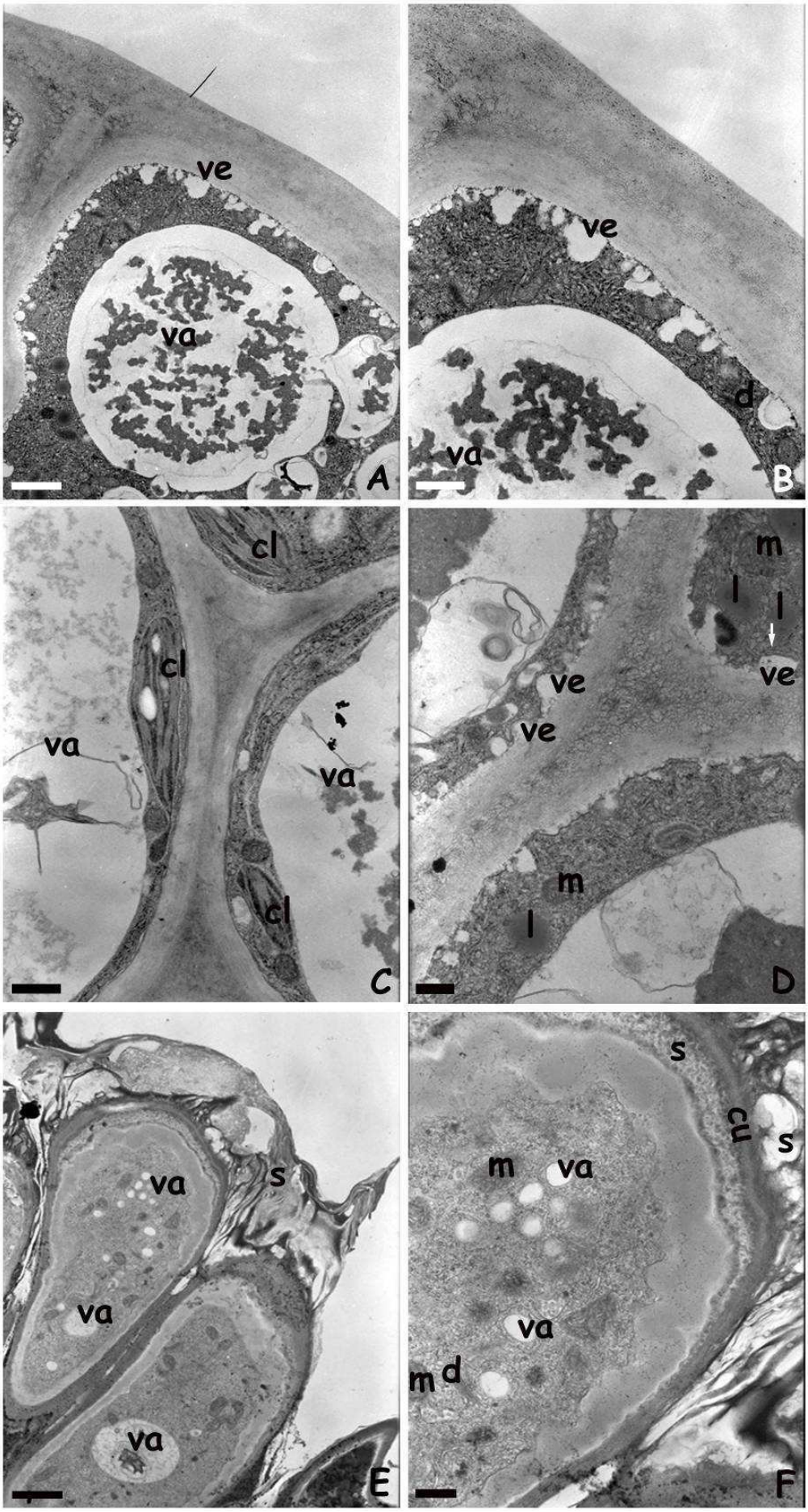

ve
va
A
ve
d
va
B
cl
cl
va
va
cl
C
m
l
l
ve
ve
ve
m
l
D
va
s
va
va
va
E
s
cl
s
m
va
va
m
d
F

Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión del estadio secretor de los NEFs de *V. candida*. A-D) Células del anillo. A) Célula epidérmica: numerosas vesículas (ve) en exocitosis y vacuolas (va) con contenido denso. B) Detalle de la anterior: puede verse un dictiosoma (d) en el citoplasma repleto de ribosomas libres. C-D) Células parenquimáticas subyacentes. C) Cloroplastos (cl) confinados contra las paredes raiales por la gran vacuola (va) central con contenido electrodenso. D) Vesículas en exocitosis, una de ellas en estrecho contacto con un dictiosomas (flecha), mitocondrias (m) y glóbulos lipídicos (l). E–F) Células centrales. E) Células centrales: pequeñas vacuolas y abundante secreción (s) por fuera de la pared tangencial externa. F) Detalle de la anterior: vacuolas, mitocondrias, dictiosomas, secreción acumulada entre la pared y la cutícula (cu) por fuera de la pared. Escalas: A, E = 2 µm; B-*C* = 1 µm; D, F = 0,5 µm.

V. caracalla

Estadio 1. Al igual que en *V. candida* y *V. adenantha* se inicia una pequeña protuberancia hemisférica, constituida por protodermis que protege las células subyacentes. Esta estructura está completamente cubierta por una bráctea con tricomas pluricelulares en su cara abaxial. Debajo de la protuberancia que posteriormente devendrá en yema floral se observan bandas procambiales y, en forma contigua del lado

opuesto a la inserción de la bráctea tectriz, el tejido subepidérmico comienza a proliferar, formando otra protuberancia, la cual, exomorfológicamente, aparece como el inicio de una formación anular compuesta por una protodermis y varias capas de células subyacentes.

Estadio 2: Debajo de la bráctea, en el ápice meristemático de la yema floral ya diferenciada, comienzan a desarrollarse dos lóbulos del cáliz (Figura 10, A). Debajo el parénquima está constituido por células esféricas o poliédricas y pueden observarse las bandas procambiales llegando a la yema floral (Figura 10, A). El anillo está totalmente diferenciado, con una epidermis y un parénquima subyacente sin espacios intecelulares (Figura 10, A); esta estructura se desarrolla a partir de células que pertenecen al eje secundario de la inflorescencia, no a la yema floral (Figura 10, A).

Estadio 3. La yema floral no continúa su desarrollo y se cae, junto con la bráctea tectriz, dejando expuestas las células centrales (Figura 10, B; Figura 11, A-B), que se tiñen intensamente con violeta de cresilo (Figura 10, B). Las células epidérmicas y el parénquima subyacente del anillo, así como las parenquimáticas subyacentes a las centrales se tiñen moderadamente con este colorante. Tanto en las células parenquimáticas como en las parenquimáticas del anillo se observan campos de puntuaciones (Figura 11, C). En las células parenquimáticas del anillo y en las subyacentes a las centrales se observa vacuolización en las células más profundamente ubicadas (Figura 11, B). La vascularización formada por xilema y floema se hace evidente, observándose entre las células parenquimáticas subyacentes y las células centrales (Figura 10, B). Este constituye el estadio secretor.

Estadio 4. La secreción del néctar cesa, las células centrales se desintegran y las células del anillo incrementan su vacuolización (Figura 11, D).

Ultrastructura del estadio secretor (Estadio 3)

Anillo. Las células epidérmicas exhiben vacuolas conspicuas, mitocondrias, dictiosomas, amiloplastos, numerosos ribosomas libres, plasmodesmos y glóbulos lipídicos (Figura 12, A-C). La pared está dividida en tres zonas de diferente electrodensidad, la zona central más fibrilar y electrondensa (Figura 12, A). Se observa secreción por fuera de la pared. Existen campos de puntuaciones observados ya con MEB (Figura 11, C) y que se corresponden con los plasmodesmos observados con MET (Figura 12, B).

Células centrales. Estas células presentan la cutícula desintegrada, grandes vacuolas, mitocondrias, dictiosomas, amiloplastos compuestos, numerosos ribosomas libres, retículo endoplasmático

rugoso y abundante secreción por fuera de la pared tangencial externa (Figura 12, C-D).

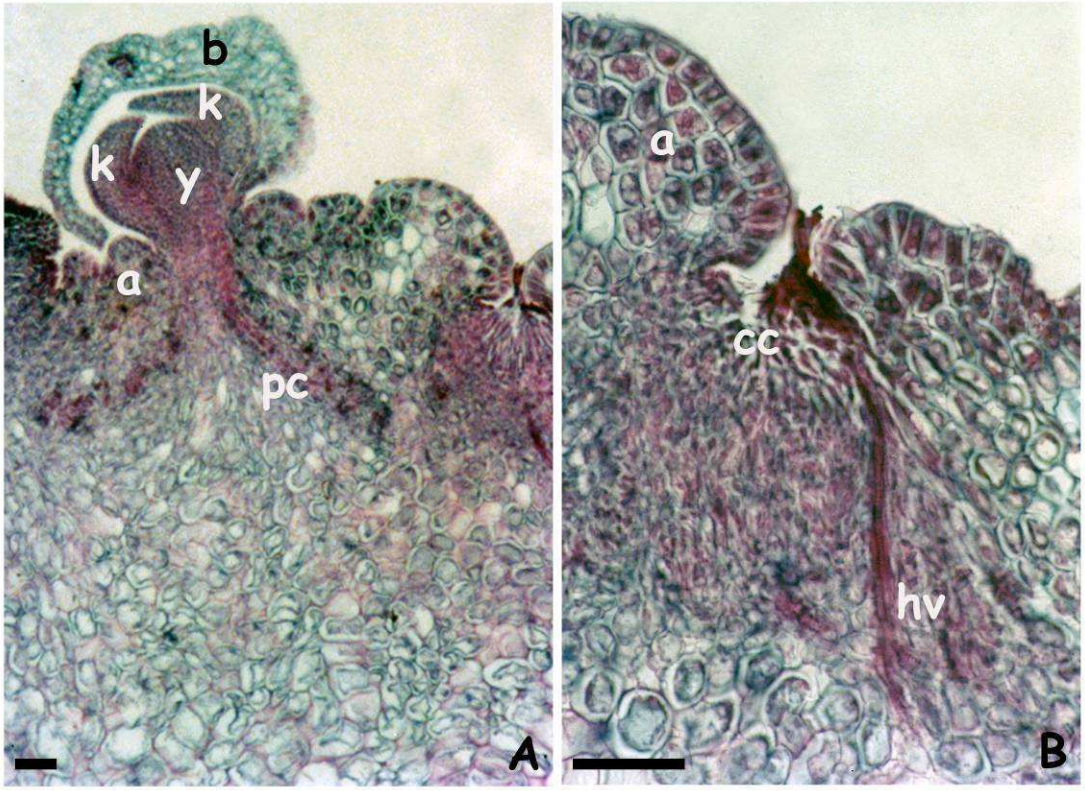


Figura 10. Microscopía óptico de la ontogenia de los NEFs de *V. caracalla*. A: estadio 2: bráctea tectriz (b), yema floral (y) con dos lóbulos del cáliz (k), anillo (a) y tejido procambial (pc) por debajo de la yema. B: estadio 3: anillo completamente formado (a), células centrales (cc) y haces vasculares (hv). Escalas: A = 4 µm; B = 10 µm.

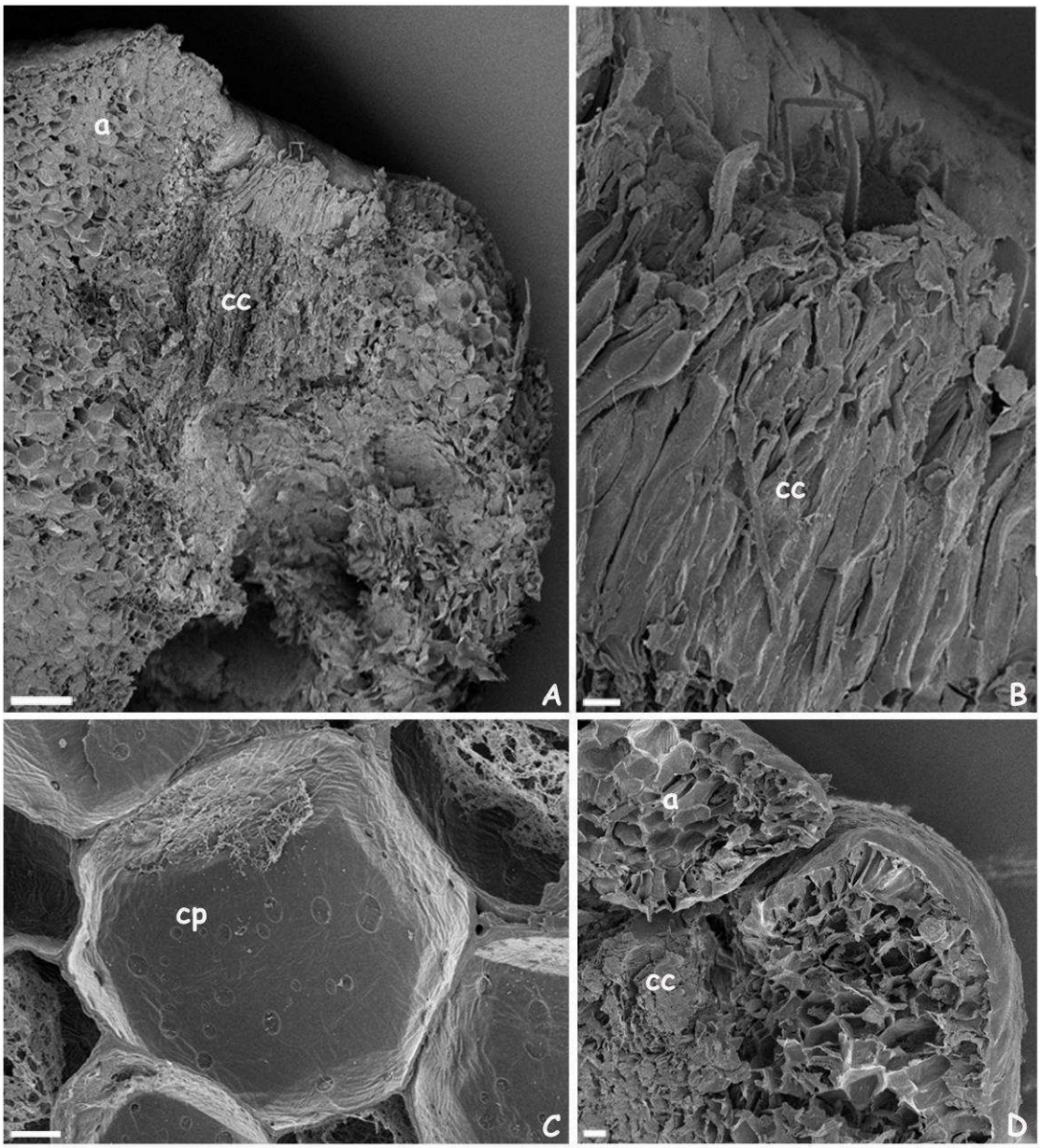


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de los NEFs de *V. caracalla*. A-C: estadio 3. A: células centrales. C: campo de puntuación (cp) primaria que conectan las células. D: estadio 4: anillo altamente vacuolizado y células centrales colapsadas. Escalas A = 100 µm; B-D = 10 µm.

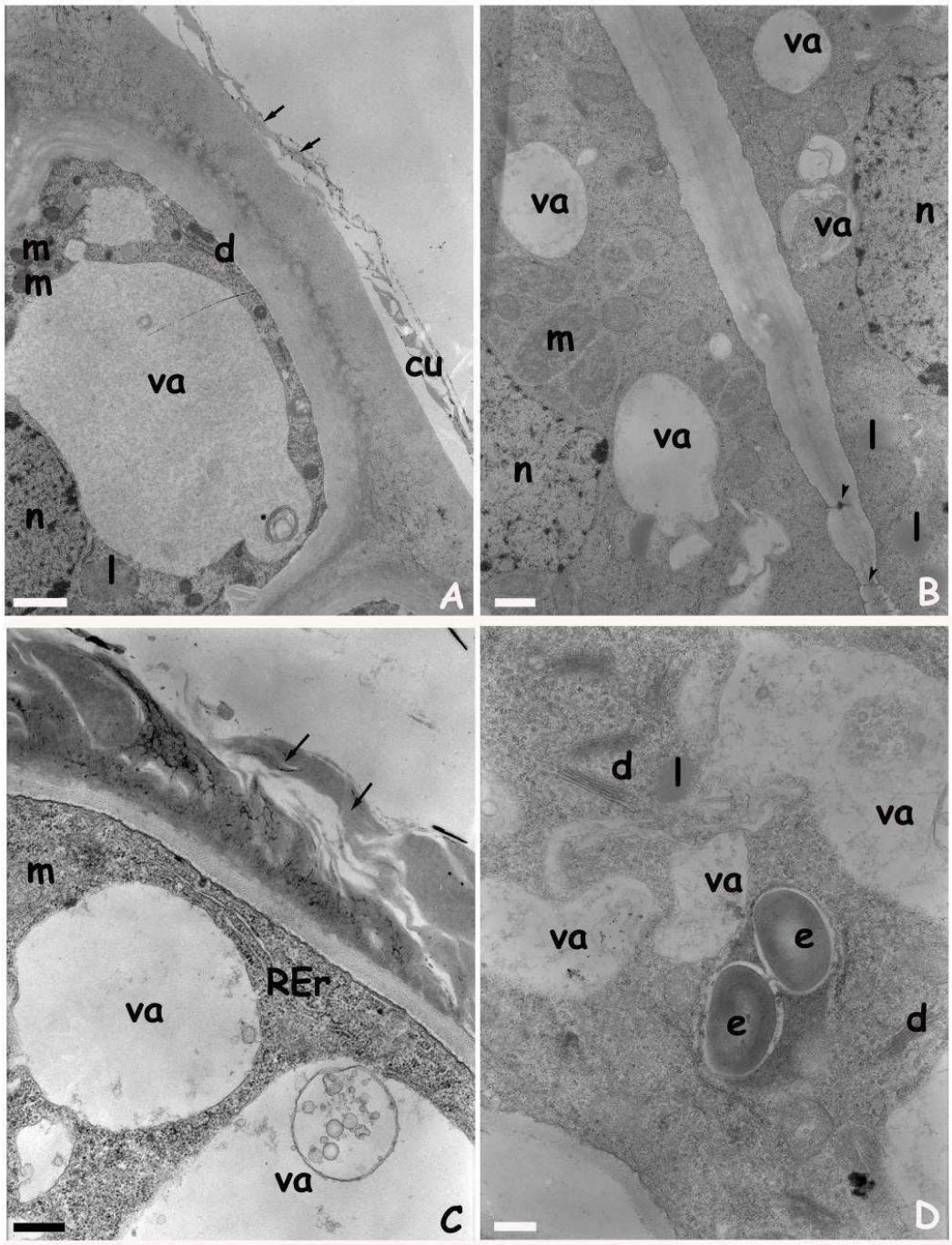


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión del estadio secretor de los NEFs de *V. caracalla*. A-B) Células del anillo. A: células epidérmicas: gran vacuola (va), ribosomas libres, núcleo (n), mitocondrias (m), dictiosomas (d), lípidos (l), cutícula (cu) desintegrándose y secreción (flechas) por fuera de la pared tangencial externa. B: células parenquimáticas subyascentes: vacuolas, ribosomas libres, núcleos, plasmodesmos (cabeza de flecha), lípidos y mitocondria. C–D: células centrales. C:

ribosomas libres, vacuolas, mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso (Rer) y secreción por fuera de de la pared tangencial externa. D: elaioplastos (e), lípidos, dictiosomas y vacuolas. Escalas: A = 2 µm; B = 1 µm; C–D = 0,5 µm.

V. luteola

Estadio 1. Se forma una pequeña protuberancia hemisférica, constituida por una protodermis la cual protege las células subyacentes. Este meristema está completamente cubierto por una bráctea y dos bracteolas (Figura 13, A), las tres con tricomas glandulares y pluricelulares en su cara abaxial. Junto a esta protuberancia, que posteriormente devendrá en yema floral, sobre el lado opuesto a la inserción de la bráctea tectriz, el tejido subepidérmico comienza a proliferar, formando otra protuberancia, la cual, exomorfológicamente, aparece como el inicio de una formación anular compuesta por una protodermis y varias capas de células subyacentes (Figura 13, A).

Estadio 2. Debajo de la bráctea tectriz y entre las bracteolas, en la yema floral comienzan a desarrollarse los lóbulos de los sépalos (Figura 13, B), las células del primordio floral se tiñen levemente por pérdida de la actividad meristemática y se distinguen grandes vacuolas (Figura 13, B). Por debajo de la pedicelo se encuentra la zona de abscisión y por debajo de ella se distinguen los haces vasculares formados por xilema y floema intensamente teñidoscon violeta de cresyl (Figura 13, C). El anillo está totalmente diferenciado, sus células epidérmicas son prismáticas y están parcialmente vacuolizadas, mientras que el parénquima subyacente está constituido por de células globosas vacuolizadas (Figura 13, C); este anillo se desarrolla a partir de células que pertenecen al eje secundario de la inflorescencia, no a la yema floral.

Estadio 3. La yema floral no continúa su desarrollo y cae, junto con la bráctea y las bracteolas, dejando

expuestas a las células centrales, las cuales se asemejan a botellas o papilas, están densamente teñidas y apretadas (Figura 13, D; Figura 14, B-D), por debajo de estas células se observan los haces vasculares (Figura 13, E). Las células del anillo están altamente vacuolizadas, y presentan espacios intercelulares (Figura 13, D). Este constituye el estadio secretor.

Estadio 4. La secreción del néctar cesa y las células centrales se comprimen y degeneran (Figura 13, F; Figura 14, E).

Ultrastructura del estadio secretor (estadio 3)

Anillo. Las células epidérmicas presentan una gran vacuola central que confina al citoplasma repleto de ribosomas libres hacia la zona periférica de cada célula; pueden observarse mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso, algunos corpúsculos electrodensos dispuestos entre la plasmalema y la

pared tangencial externa, así como también por fuera en la pared (Figura 15, A-B). En el citoplasma de las células parenquimáticas subyacentes se observan grandes vacuolas, mitondrias, cloroplastos, retículo endoplasmático rugoso y ribosomas libres (Figura 15, C–D). Existen conexiones plasmodésmicas entre células adyacentes (Figura 15, D).

Células centrales. Presentan una cutícula electrondensa. En cada célula se observa una vacuola central desplazando el citoplasma hacia la plasmalema; en el citoplasma se distinguen amiloplastos, dictiosomas con numerosas vesículas, glóbulos lipídicos, retículo endoplasmático rugoso y ribosomas libres (Figura 16, A-C). Las células parenquimáticas subyacentes poseen núcleos prominentes, pequeñas vacuolas con contenido fibrilar y electrondenso, dictiosomas, ribosomas libres, mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, plástidos. Las paredes de estas células está

invaginada en gran parte de su extensión y existen conexiones citoplasmáticas (Figura 16, D).

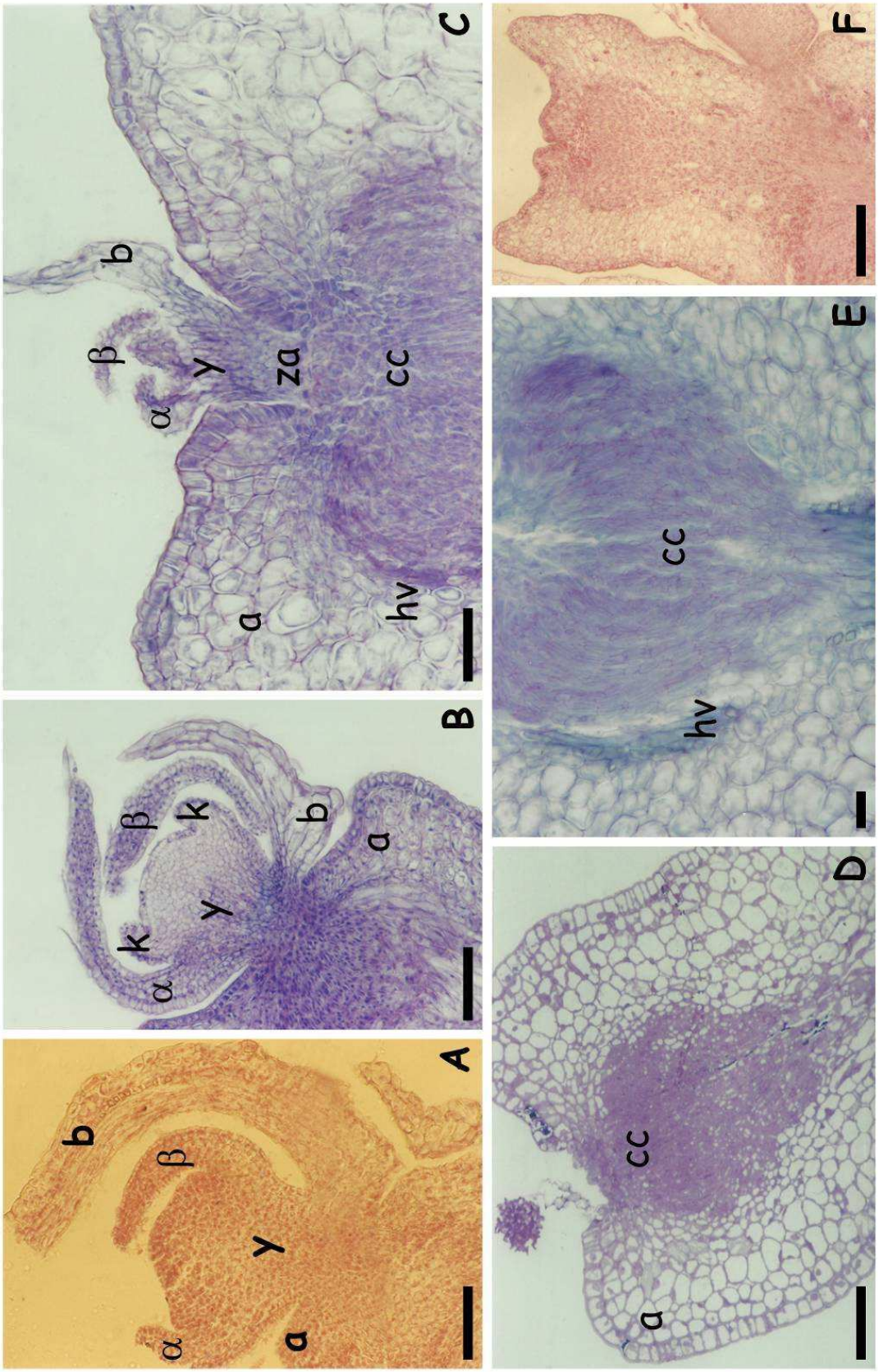


Figura 13. Microscopía óptico de la ontogenia de los NEFs de *V. luteola*. A: estadio 1: anillo (a) en desarrollo, bráctea tectriz (b) protegiendo las

bracteolas (α y β) y la yema floral (y). B-C: estadio 2. B: anillo totalmente desarrollado, la bráctea tectriz cubriendo las bracteolas y la yema floral, la cual presenta los lóbulos del cáliz (k) en desarrollo. C: anillo, bráctea tectriz protegiendo a las bracteolas y a la yema floral en la cual puede observarse la zona de abscisión (za); por debajo de ésta se encuentran las células centrales (cc) y haces vasculares (hv) acompañándolas. D: estadio 3: nectario vulcaniforme con las células centrales densamente teñidas en contraste con las células del anillo altamente vacuolizadas. E: haces vasculares en el estadio 3. F: estadio 4: aspecto general del NEF inactivo con las células centrales reducidas. Escalas: A-D, F = 10 µm; E = 4 µm.

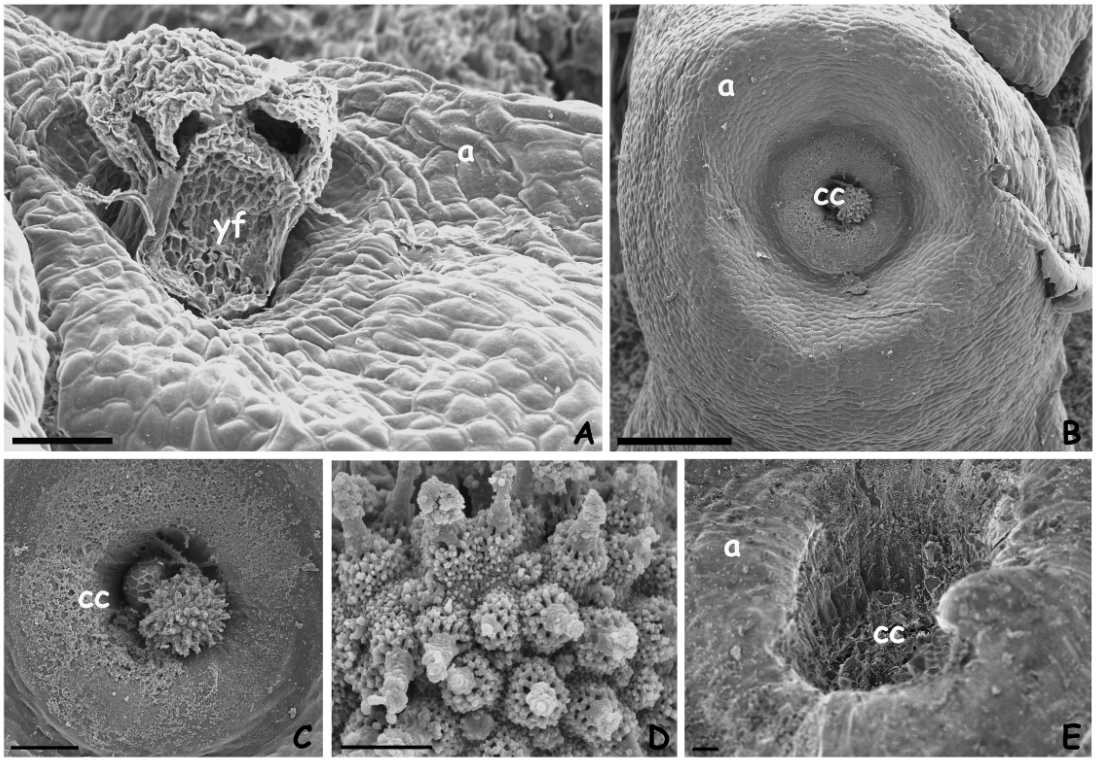


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido de los NEFs de *V. luteola*. A: estadio 2: yema floral separada rodeada por un anillo (a) incipiente. B: estadio 3: NEF vulcaniforme con las células centrales (cc) rodeadas por un anillo completamente desarrollado. C: estadio 3: células centrales

alargadas transformadas en papilas D: detalle de las células centrales. E: estadio 4: NEF inactivo, células centrales degeneradas. Escalas: A, C = 50 µm; B = 200 µm; D-E= 10 µm.

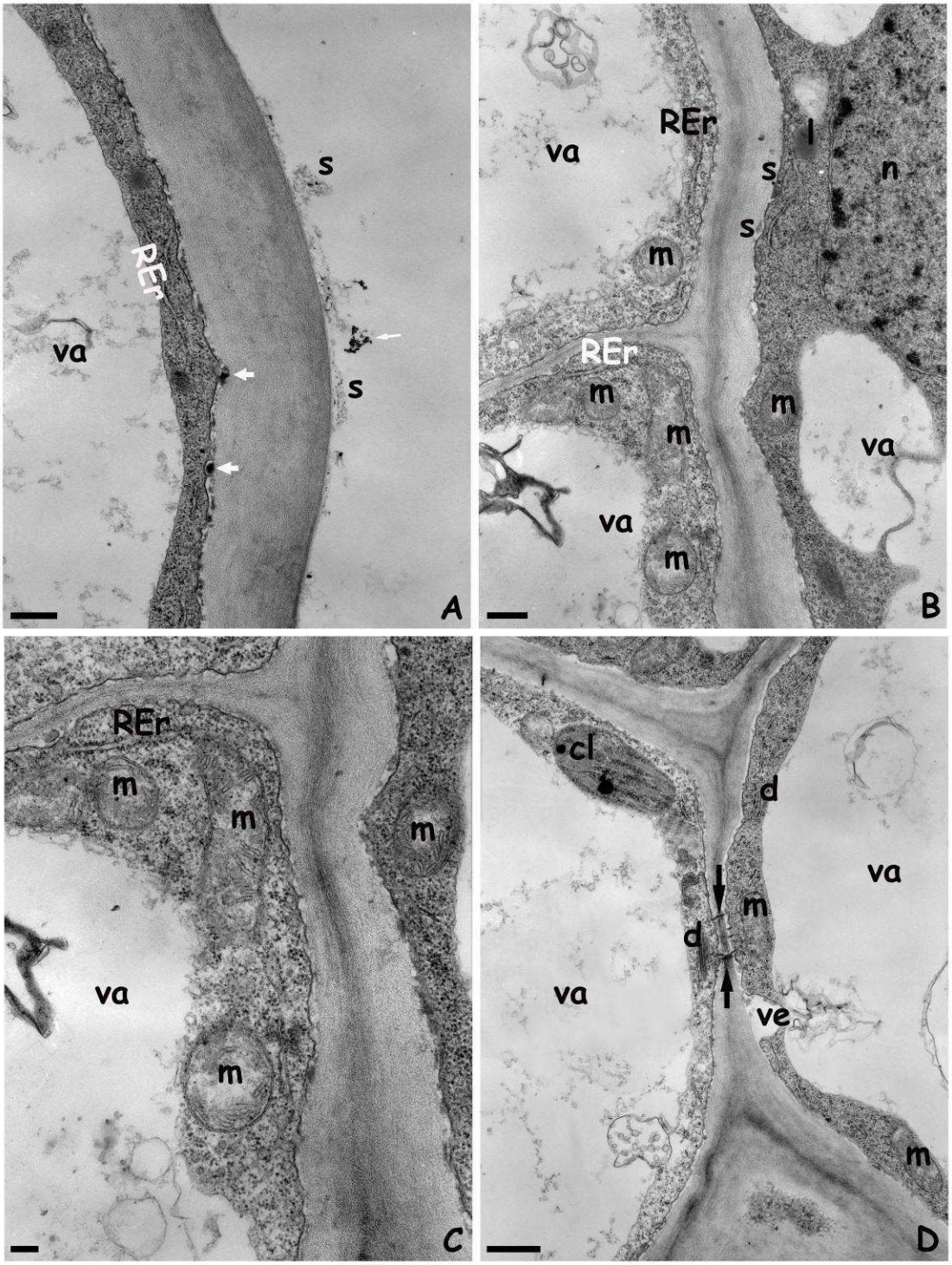


Figura 15. Microscopía electrónica de transmisión del estadio secretor de los NEFs de *V. luteola* (anillo). A: detalle de una célula epidérmica con REr,

corpúsculos electrondensos entre la membrana plasmática y la pared tangencial externa, así como por fuera de la pared (flechas blancas), donde también se observa secreción (s). B: detalle de una célula epidérmica (derecha) y dos subyacentes (izquierda): en la epidérmica se observan glóbulos lipídicos (l), mitocondrias (m) y secreción proveniente del parénquima subyacente, en la subyacentes se observan mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso (REr). C: detalle de 1 células parenquimática subyacente con ribosomas libres, mitocondrias (m) y el retículo endoplasmático rugoso. D: plasmodesmos (flechas negras) conectando células parenquimáticas adyacentes, cloroplastos (cl), dictiosomas (d) y mitocondrias. Escalas: A, B = 0, 5 µm; C = 0,2 µm; D = 1 µm.

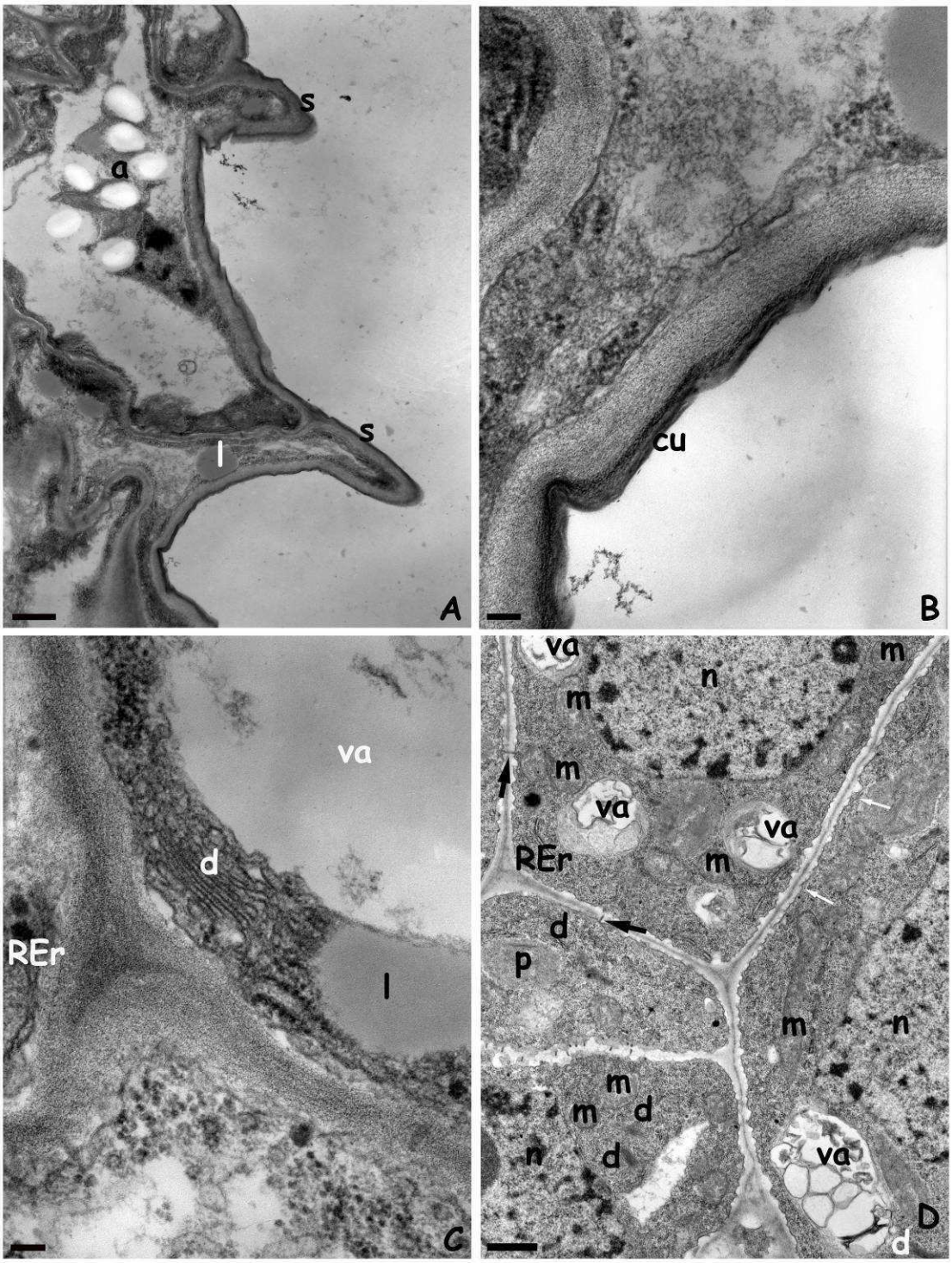


Figure 16. Microscopía electrónica de transmisión del estadio secretor de los NEFs de *V. luteola* (células centrales). A: sección longitudinal de la porción apical de una célula central, donde se observan amiloplastos (a), glóbulos lipídicos (l) y secreción (s) por fuera de la pared. B: detalle de la pared de las células papilosas con la cutícula (cu) electrondensa. C: detalle de las células papilosas: glóbulos lipídicos (l), REr y dictiosomas (d). D:

células parenquimáticas subyacentes: REr, plástidos (p), abundantes mitocondrias, vacuolas (va), invaginaciones de la pared (flechas blancas) y plasmodesmos (flechas negras). Escalas: A, D = 1 µm; B-C = 0, 1 µm.

Esporogénesis y gametogénesis

La ontogenia del primer NEF en desarrollo fue relacionada con los diferentes estadios de la microesporogénesis, megaesporogénesis, microgametogénesis y megagametogénesis de las yemas florales del nudo correspondiente, observándose las siguientes similitudes en las cuatro especies.

Estadio 1. En las anteras las células madres de las micrósporas (Figura 17, A), se aíslan de las restantes mediante la deposición de calosa (Figura 17, B); al mismo tiempo, en el ovario, la célula madre de las megásporas aún no ha sufrido meiosis (Figura 18, A).

Estadio 2. En las anteras, ya se produjo la meiosis, se observan las tétradas de micrósporas (Figura 17, C), en tanto en el ovario las megásporas comienzan la división mitótica (Figura 18, B).

Estadio 3. Los granos de polen ya se diferenciaron en las anteras, persiste algo del tapete; en el ovario, la megáspora continúa con el proceso mitótico.

Estadio 4. Las anteras están dehiscentes y el tapete está completamente disuelto (Figura 17, D), mientras que en los óvulos, el megagametófito está totalmente diferenciado (Figura 18, C). En este momento se inicia la antesis.

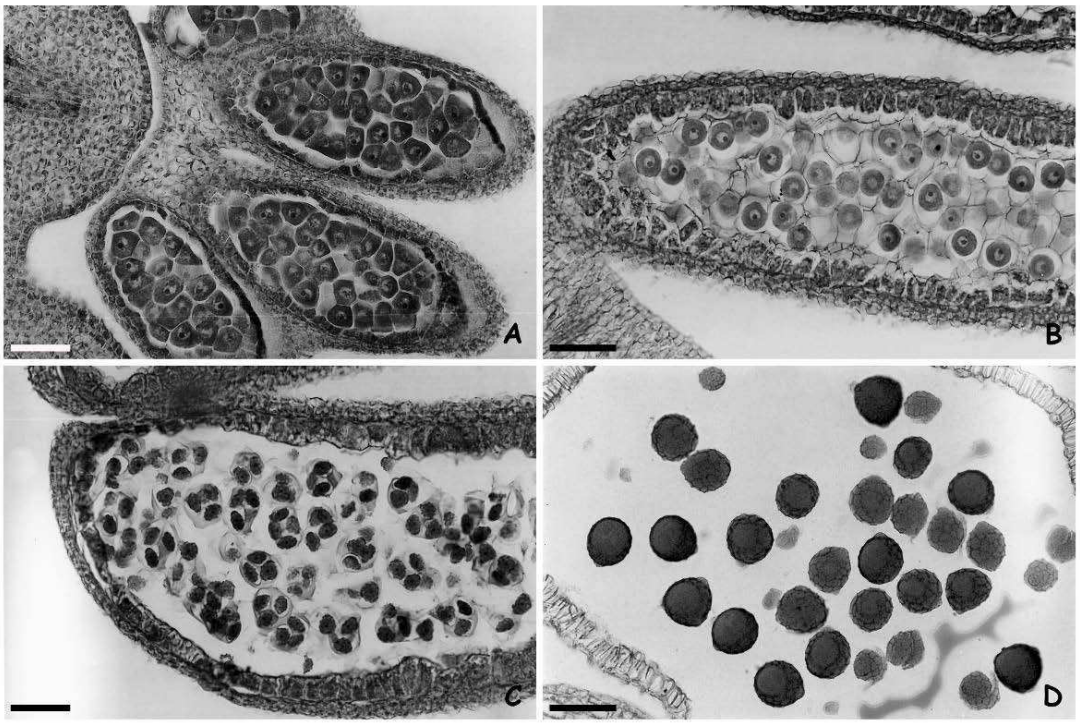


Figura 17. Microscopía óptica de la microesporogénesis y microgametogénesis de *Vigna*. A: células madres de las micrósporas. B: células madres de las micrósporas en la primera división meiótica. C: tétradas de micrósporas. D: granos de polen. Escala = 10 µm.

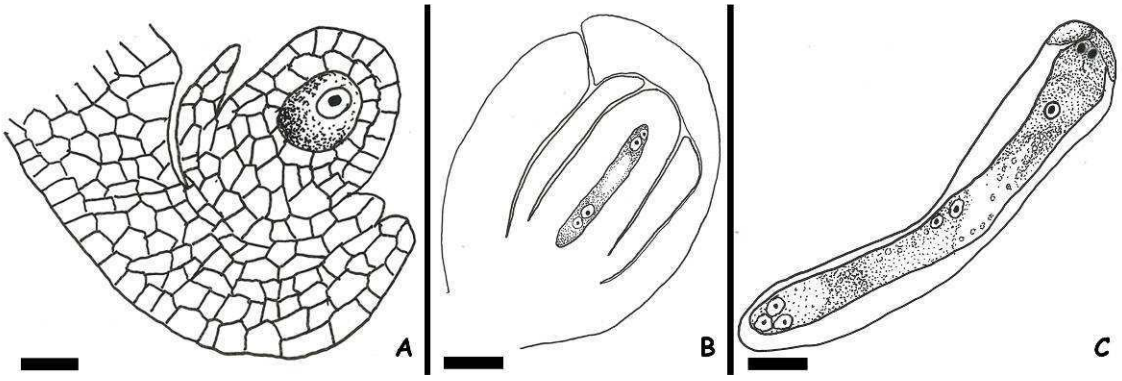


Figura 18. Representación esquemática de la megaesporogénesis y megametogénesis de *Vigna*. A: célula madre de las megásporas. B: segunda división mitótica de la megáspora. C: megagametófito. Escalas = 5 µm.

Período de actividad de los NEFs en cada eje secundario

Durante el desarrollo de la inflorescencia, una vez que el primer NEF de un eje secundario alcanza el estadio 3, el segundo NEF comienza a diferenciarse en sentido acrópeto y así sucesivamente.

En *V. adenantha*, *V. candida* y *V. caracalla* se siguen diferenciando NEFs después de que el primero alcanza el estadio 4, mientras que en *V. luteola* el único NEF funcional llega al estadio 4 al inicio de la antesis.

En las tres especies perennes se observó que cuando los frutos tienen embriones en el estadio globular, hay al menos un NEF en el estadio 4, uno en el estadio 3 y uno en el estadio 1, de esta manera el proceso coexiste y la actividad de los NEFs es continua hasta la madurez de los frutos, mientras que en *V. luteola*, especie anual, la secreción se detiene con el inicio de la maduración de los frutos

dado que existe un solo NEF funcional por eje secundario.

CAPÍTULO IV

INTERACCIÓN DE LOS NEFS CON SUS VISITANTES

Introducción

Varios autores han estudiado a las Leguminosae mirmecófilas con NEFs (Koptur, 1979; 1984; 1991; McKey, 1989; Diaz-Castelazo et al, 2004; Mizell, 2004; Katayama & Susuki, 2010) que fluctuan entre un mutualismo intermedio dentro de un gradiente que va desde el obligado al laxo (del Val & Dirzo, 2004).

Los ensambles de hormigas pueden variar entre taxones de plantas e incluso para una misma especie de planta entre el día y la noche (Hossaert-McKey *et al.*, 2001) o entre localidades (Howe & Westley, 1988).

Los hemípteros Auschenorhyncos suctores de savia y excretores de líquidos azucarados (áfidos, cochinillas, entre otros) a menudo establecen relaciones tróficas con las Leguminosae, distrayendo la atención de las hormigas de los NEFs con consecuencias en la protección de las plantas

(Buckley, 1983; Delabie & Fernández, 2003; Katayama & Susuki, 2003).

En el género *Vigna* se registraron avispas visitando los NEFs de *V. unguiculata* en busca de alimento, siendo éstos la fuente más importante para el mantenimiento de la población de este himenóptero (Marques *et al*., 2005). En *V. adenantha* (Di Stilio *et al.*, 1991) y en *V. longiflora* (Hoc *et al.*, 1993) se detectaron tanto hormigas como avispas visitando los NEFs y ahuyentando a los visitantes florales no legítimos. En *V. caracalla* se observaron solamente individuos del género *Camponotus* libando estas estructuras durante la floración y hasta la formación de los frutos (Etcheverry, 2005). En *V. luteola* hubo discordancias en las observaciones, ya que Agulló *et al.* (1993) y Gamba *et al.* (2000) determinaron que individuos de *Camponotus* sp. establecen un mutualismo laxo, mientras que Koptur (1992a) y Koptur *et al.* (2010) consideraron entre otros taxones de hormigas a individuos de *Camponotus* sp. dentro de un mutualismo obligado;

esta contradicción podría deberse a varios factores: a que se trate de la misma especie de *Camponotus*, ya que los autores citados no mencionaron la identidad específica, a que una sola especie de planta puede atraer un amplio espectro de hormigas, siendo unas más eficientes que otras en la defensa (del Val & Dirzo, 2004), o a la influencia de factores abióticos sobre las especies tanto de plantas como de hormigas, como ser los nutrientes, la cantidad de horas de luz, la altitud, la humedad (Koptur, 1985; 1992b; Kersch & Fonseca, 2005), así como también la distancia de los nidos hasta las plantas (Bentley, 1977a; McKey, 1989; Koptur, 1992b).

En algunos casos este gradiente de mutualismo entre hormigas y especies de *Vigna* se registraron brúquidos alimentándose de las semillas, disminuyendo de esta manera el éxito reproductivo de las plantas (Koptur & Lawton, 1988; Ruhren, 2003; De la cruz *et al.*, 2013), en estos casos las

hormigas no defenderían a las plantas del ataque de los brúquidos.

Resultados

Identidad y actividad de los visitantes

Los libadores de los nectarios extraflorales fueron hormigas (Hymenoptera, Formicidae).

Se observaron las siguientes especies de hormigas:

- *Camponotus mus* (Mayr) (Formicinae) "hormiga carpintera"

- *Linepithema humile* (Mayr) (Dolichoderinae) "hormiga argentina"

- *Solenopsis* sp (Westwood) (Myrmicinae) "hormiga colorada"

- *Acromyrmex lundi* (Guérin-Méneville) (Formicidae) "hormigas cortadoras"

La aparición en los diferentes sitios, especies de *Vigna* y temporadas de observación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Identidad de las hormigas, en cada especie de *Vigna* y en cada sitio.

Especies	Años	Sitios	Identidad de las hormigas
V. adenantha	2008	Campo Experimental de la FCEyN (UBA), C.A.B.A.	*Camponotus mus* *Linepithema humile*
	2010	Parque Municipal San Carlos, Concordia, Entre Ríos	*Camponotus mus* *Solenopsis* sp.
		Campo Experimental de la FCEyN (UBA), C.A.B.A.	*Linepithema humile*
	2011	Parque Municipal San Carlos, Concordia, Entre Ríos	*Camponotus mus* *Solenopsis* sp.
	2011	Campo Experimental de la FCEyN (UBA), C.A.B.A.	*Linepithema humile*
	2012		
V. candida	2008	Salta, depto. Capital, Salta	*Camponotus mus*

	2011	Campo Experimental de la FCEyN (UBA), C.A.B.A.	*Linepithema humile*
	2012		*Linepithema humile* *Acromyrmex lundi*
V. caracalla	2008	Vaqueros, depto. La Caldera, Salta	*Camponotus mus*
	2011	Campo Experimental de la FCEyN (UBA), C.A.B.A.	*Linepithema humile*
	2012		
V. luteola	2008	Refugio Natural Educativo Rivera Norte, Bs. As.	*Linepithema humile* *Solenopsis* sp.
	2011	Campo Experimental de la FCEyN (UBA), C.A.B.A.	*Linepithema humile*
	2012		*Linepithema humile* *Acromyrmex lundi*

Análisis preliminares (2008) en poblaciones naturales

Las hormigas recorrían durante todo el día las inflorescencias de las cuatro especies, libando los NEFs (Figura 1).

La interacción de las hormigas con los insectos y la actividad de los fitófagos se resume en la Tabla 2 y se detalla a continuación. En *V. candida* se las observó desplazando a coleópteros que se alimentaban de las alas de las flores; también se las vio interfiriendo en la polinización, ahuyentando a los polinizadores que intentaban libar en las flores. En *V. luteola*, se detectaron libando las excreciones de áfidos (Hemiptera, Sternorrhyncha, Aphidoidea), los cuales infestaban por completo las inflorescencias; en este caso, las hormigas no libaban los NEFs. En cambio, en las otras especies no se observaron áfidos ni otros insectos en asociación trófica con las hormigas y éstas solo libaban los NEFs; en *V. adenantha* y *V. caracalla*

recorrían los NEFs sin interactuar con otros insectos.

De las tres especies de hormigas, *C. mus* fue la más agresiva, desplazando a *L. humile* de las inflorescencias a las que éstas arribaban. En el caso de *L. humile* y *Solenopsis* sp. no hubo desplazamientos entre sí y ambas especies libaban al mismo tiempo.

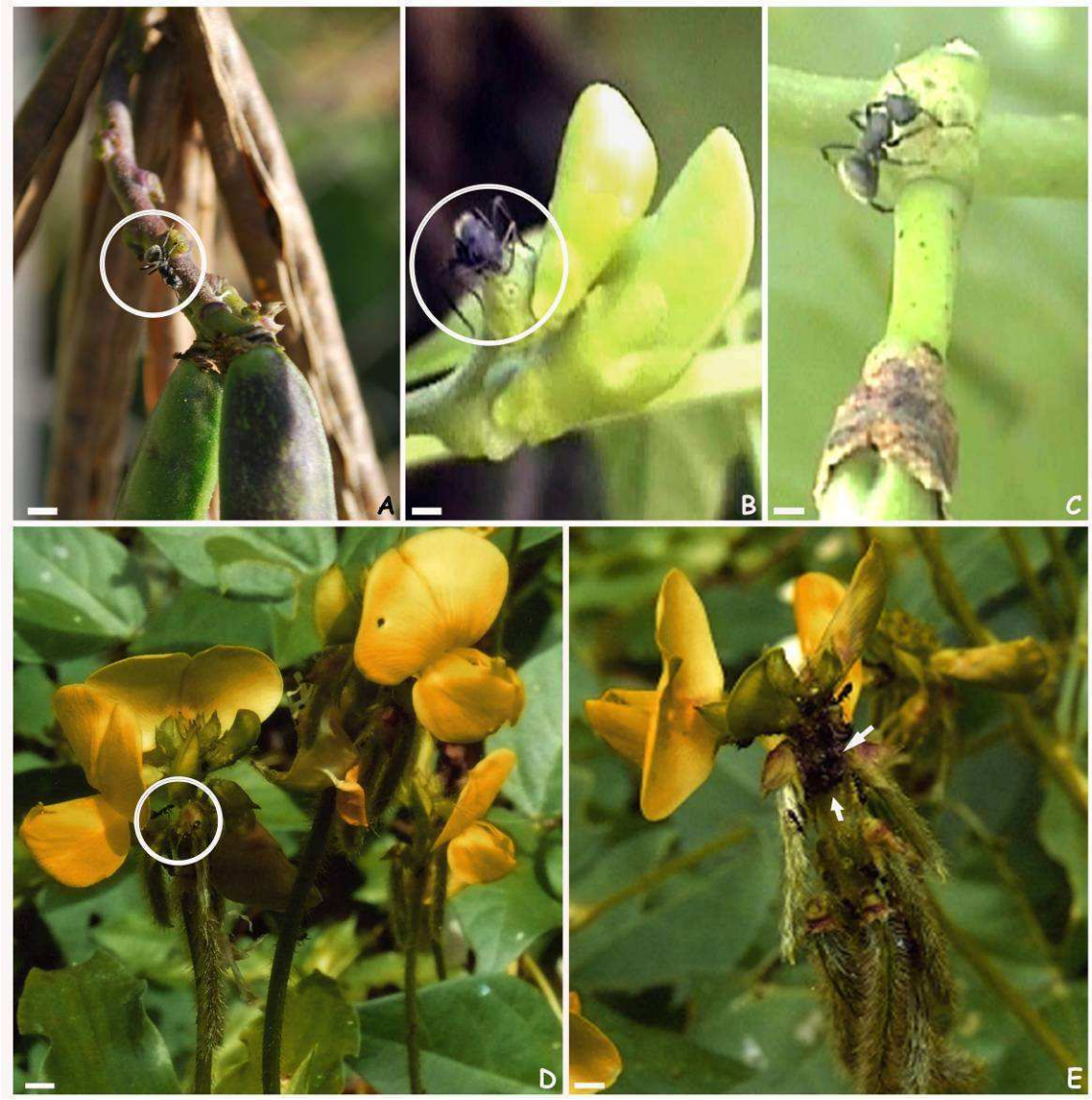


Figura 1. Actividad de las hormigas en los NEFs. A: *V. adenantha*. *C. mus* inspeccionando un pedúnculo. B: *V. candida*. *C. mus* libando los NEFs. C: *V. caracalla*. *C. mus* libando los NEFs. D-E: *V. luteola.* D: *L. humile* y *Solenopsis* sp. inspeccionando un pedúnculo. E: *L. humile* Y *Solenopsis* sp. en trofobiosis con áfidos, la flecha indica la colonia de áfidos. Escalas: A = 4,7 mm; B = 3,5 mm; C = 2,6 mm; D = 3,8 mm; E = 11,5mm.

Tabla 2. Interacción de las hormigas con los insectos y actividad de los fitófagos durante las observaciones preliminares en 2008.

Plantas / Insectos	*V. adenantha*	*V. candida*	*V. caracalla*	*V. luteola*
Hormigas asociadas a los NEFs	Indiferentes a los fitófagos y/o polinizadores	Desplazaban a los coleópteros florívoros y a los polinizadores	Indiferentes a los fitófagos y/o polinizadores	Libaban las excreciones de los áfidos
Áfidos				Succionaban la savia en tallos e inflorescencias
Brúquidos	Oviponían en los frutos y se alimentan de las semillas			
Escarabajos		Se alimentaban de las flores	Se alimentaban de las flores	

Análisis definitivo (2010-2012)

a) En poblaciones naturales

Durante 2010 y 2011 en el Parque Municipal San Carlos, Concordia, Entre Ríos se observó en *V. adenantha* a individuos de *Camponotus mus* (Fig. 2) y *Solenopsis* sp., libando sobre los NEFs, pero no ocurrió solapamiento temporal entre ambos taxones; no interferían con los polinizadores pero tampoco ahuyentaban a los fitófagos, lo cual se vio reflejado en el estado general de las plantas, que presentaban severos ataques por langostas y otros herbívoros (Tabla 3).

En ambas temporadas los frutos estaban infestados por brúquidos (Coleoptera, Bruchidae), los cuales emergían de las semillas de los frutos secos colectados.

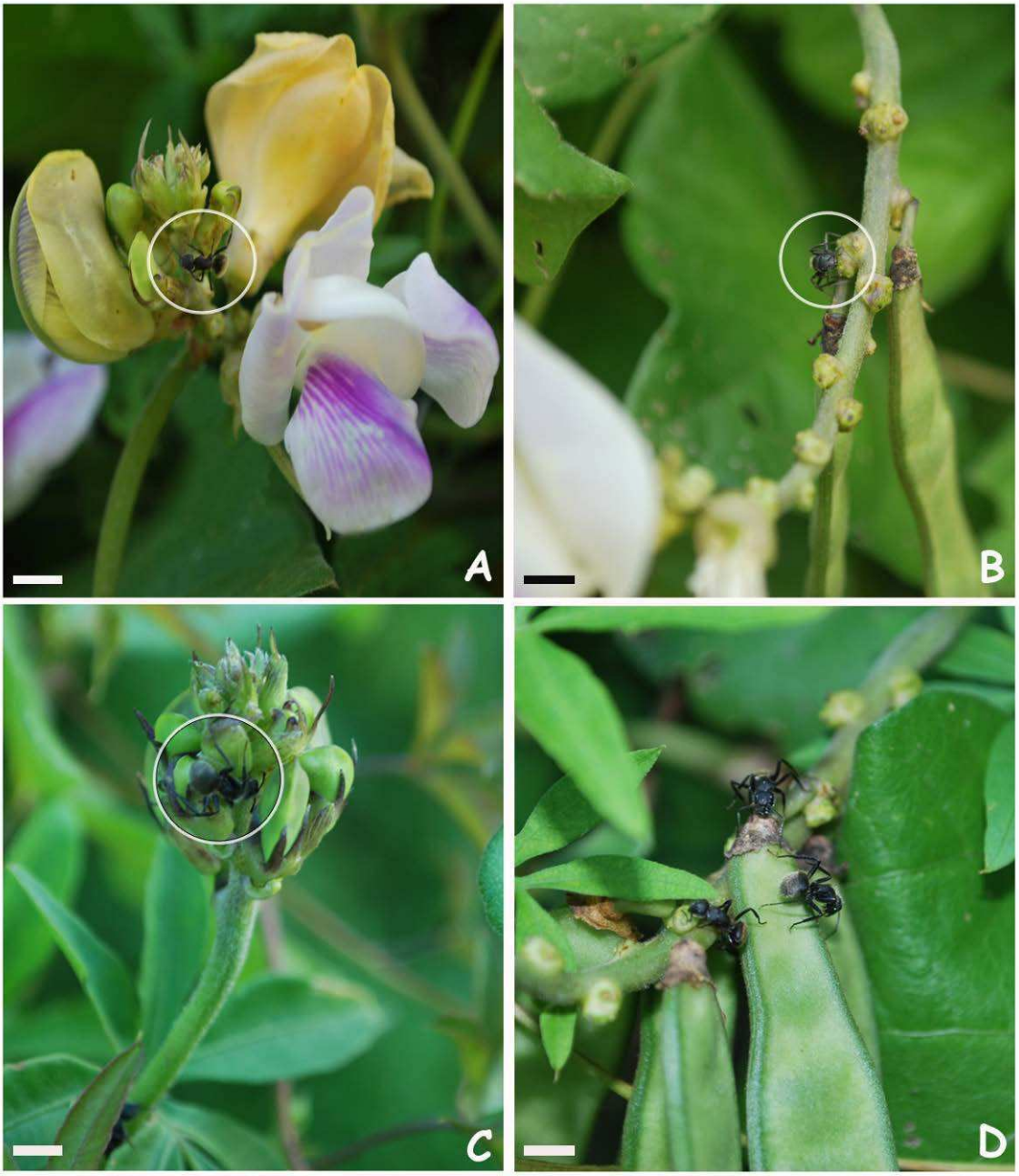


Figura 2. Actividad de las hormigas en *V. adenantha* en Concordia (Entre Ríos). A, B: 2011. C, D: 2012. A: *C. mus* libando los NEFs entre las flores. B, D: *C. mus* libando los NEFs entre los frutos. C: *C. mus* libando los NEFs entre los capullos. A = 5,3 mm; B = 10 mm; C = 3,6 mm; D= 5,3 mm.

b) En el cultivo experimental

En el cultivo que se desarrolló durante 2010-2012 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires) ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, en las cuatro especies se observó a individuos de *L. humile* (Figura 3). Los formícidos libaban sobre los NEFs pero no ahuyentaban a los fitófagos (heterópteros y abejas) ni a los frugívoros (coleópteros). En algunos casos, como en *V. adenantha* y *V. candida*, ordeñaban cochinillas (Hemiptera, Sternorrhyncha, Coccoidea); en *V. caracalla* y *V. luteola* atendían áfidos (Hemiptera, Sternorrhyncha, Aphidoidea); ambos esternorrincos se hallaban sobre los tallos y los ejes de las inflorescencias (Tabla 3).

En *V. adenantha*, durante los tres años de estudio se observaron brúquidos emergiendo de las semillas en los frutos secos colectados y en aquellos secos que aún permanecían en las plantas; también durante las tres temporadas de cultivo las cochinillas infectaron plantas de *V. adenantha*.

En cambio, en *V. candida*, durante los dos años de observación, muy pocas plantas fueron atacadas por cochinillas y sólo un fruto de una planta presentó infestación por brúquidos durante 2012, período en el que las hojas también fueron levemente atacadas por hormigas cortadoras (Tabla 3).

En *V. caracalla*, se detectó la presencia de áfidos sobre los tallos y los ejes de las inflorescencias y algunos heterópteros sobre las inflorescencias durante los dos años de cultivo, pero no hubo ataque de brúquidos.

V. luteola fue la especie más comprometida. Todas las plantas fueron atacadas por áfidos durante los tres años de cultivo, en algunos casos esto impidió el seguimiento de los tratamientos; durante 2012 las plantas fueron defoliadas por hormigas cortadoras (Tabla 3). Sin embargo, en ninguna de las temporadas se registró la presencia de brúquidos en los frutos ni las semillas.

Figura 3. Actividad de las hormigas en el cultivo. A: *V. adenantha*. Individuos de *L. humile* libando los NEFs, mientras un ejemplar de *A. mellifera* visita una flor en fase 2 (flecha). B: *V. candida. L. humile* inspeccionando una flor. C: *V. caracalla*. *L. humile* libando varios NEFs en una inflorescencia. D: *V. luteola. L. humile* atendiendo áfidos; las flechas indican las hormigas y las puntas de flechas los

áfidos. Escalas: A = 4,7 mm; B = 2,6 mm; C = 1,8 mm; D = 0,7 mm.

Tabla 3. Interacción de las hormigas con los insectos y actividad de los fitófagos durante las observaciones definitivas.

Plantas / Insectos	*V. adenantha*	*V. candida*	*V. caracalla*	*V. luteola*
Hormigas asociadas a los NEFs	ordeñaban cochinillas	ordeñaban cochinillas	atendían a los áfidos	atendían a los áfidos
Cochinillas	Succiona-ban la savia en tallos	Succiona-ban la savia en tallos		
Áfidos			Succiona-ban la savia en tallos	Succiona-ban la savia en tallos
Brúquidos	Oviponían en los frutos y se alimentan de las semillas			
Coleópteros	Se alimenta-ban de las flores y hojas jóvenes			
Ortópteros	Se alimenta-ban de las hojas			
Heterópteros			Succiona-ban la savia	
Hormigas cortadoras		Defoliaban las plantas		Defoliaban las plantas

Experimentos de exclusión de visitantes de los NEFs

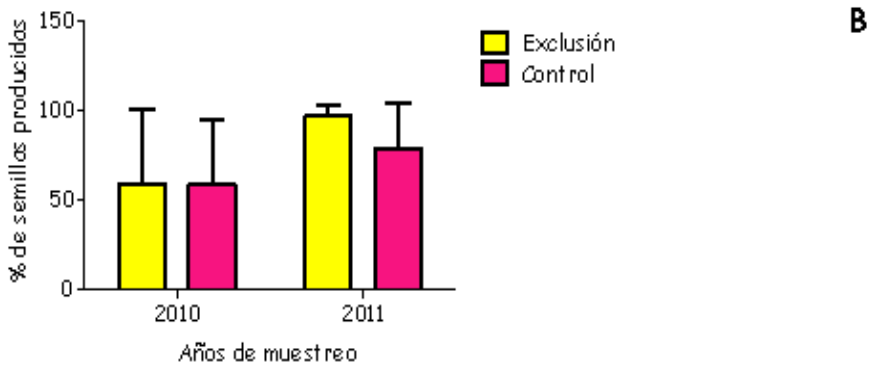
Como ya se explicó en los métodos, los resultados obtenidos durante los años de experimentos en la población de *V. adenantha* en Concordia (Entre Ríos), de *V. luteola* en el cultivo y las comparaciones entre sitios de *V. adenantha* fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal Wallis, debido a que el tamaño muestral no se ajustaba a uno paramétrico; no se incluyeron en este análisis el porcentaje de semillas infestadas ya que no se contabilizaron semillas en ese estado para los dos años de experimento.

Para los resultados experimentales de *V. adenantha* y *V. candida* en el cultivo, los datos correspondientes al porcentaje de frutos producidos fueron transformados con la función logarítmica antes de realizar el ANOVA, ya que la distribución no cumplía con los supuestos de este test; las demás variables fueron analizadas sin la aplicación de esta transformación.

a) En poblaciones naturales

Al analizar las poblaciones naturales de *V. adenantha* (Figura 4, A-B), no se encontraron diferencias significativas entre el control y la exclusión dentro de cada año para ninguna de las variables en estudio (% de frutos y % de semillas producidas). Al comparar la respuesta de las diferentes variables entre años, tampoco se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de frutos (Figura 4, A) ni para el porcentaje de semillas producidas (Figura 4, B). Por lo tanto, la interacción entre los formícidos y *V. adenantha* no fue benéfica para las plantas durante 2010–2011 en Concordia.

Sitios	Variable	Tratamientos	Años	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Concordia	% frutos producidos	Control	2010	10	15,03	7,68	16,90	2,96	0,3974
Concordia	% frutos producidos	Control	2011	4	13,94	7,72	11,81		
Concordia	% frutos producidos	Exclusión	2010	9	17,81	11,04	16,67		
Concordia	% frutos producidos	Exclusión	2011	6	10,17	7,59	7,29		



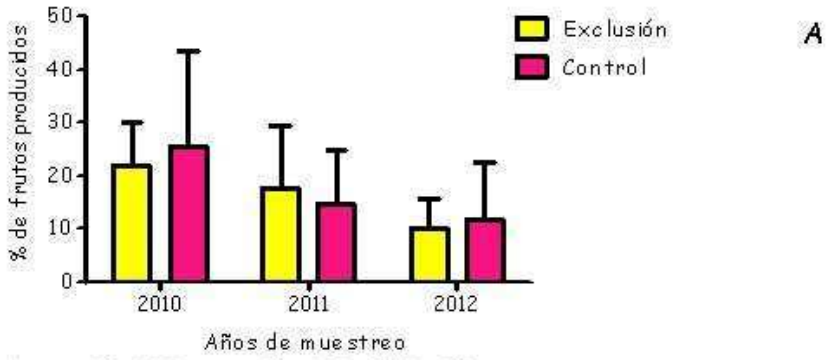
Sitios	Variable	Tratamientos	Años	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Concordia	% semillas producidas	Control	2010	8	59,30	35,76	56,11	4,18	0,2223
Concordia	% semillas producidas	Control	2011	3	78,57	25,75	85,71		
Concordia	% semillas producidas	Exclusión	2010	7	59,01	41,70	80,00		
Concordia	% semillas producidas	Exclusión	2011	4	97,12	5,77	100,00		

Figura 4. Producción de frutos y semillas durante los dos años de experimento de *V. adenantha* en Concordia (Entre Ríos). A: porcentaje de frutos producidos; n = número de inflorescencias marcadas. B: porcentaje de semillas totales producidas; n = número de frutos contabilizados.

b) En el cultivo experimental

V. adenantha

Al analizar las variables medidas durante las 3 temporadas de cultivo no se observaron diferencias significativas entre tratamiento y control (Figura 5, A-C), pero en el análisis entre los 3 años se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de frutos (Figura 5, A), entre 2011 vs. 2010 y 2012 para el porcentaje de semillas producidas (Figura 5, B) y entre 2010 vs. 2011 y 2012 para el porcentaje de semillas infestadas (Figura 5, C). Estas diferencias entre años evidencian la variabilidad temporal de la interacción entre las plantas de esta especie y las hormigas.



Sitios	Variable	N	R²	R² Aj	CV
CABA	% frutos producidos	400	0,12	0,11	75,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5014,48	5	1002,90	10,66	<0,0001
Años	4583,30	2	2291,65	24,36	<0,0001
Tratamientos	20,87	1	20,87	0,22	0,6379
Años*Tratamientos	415,37	2	207,69	2,21	0,1113
Error	37059,35	394	94,06		
Total	42073,84	399			

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 94,0593 gl: 394

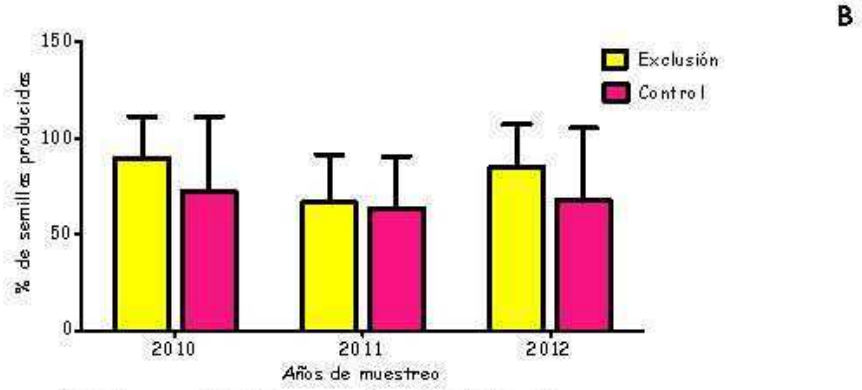
Años	Medias	n	E.E.			
2010	23,70	20	2,17	A		
2011	16,09	103	0,96		B	
2012	10,82	277	0,58			C

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 94,0593 gl: 394

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
Control	17,25	202	1,15	A	
Exclusión	16,49	198	1,15	A	

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 94,0593 gl: 394

Años	Tratamientos	Medias	n	E.E.				
2010	Control	25,43	10	3,07	A			
2010	Exclusión	21,96	10	3,07	A			
2011	Exclusión	17,50	51	1,36		B		
2011	Control	14,69	52	1,34		B	C	
2012	Control	11,64	140	0,82			C	D
2012	Exclusión	9,99	137	0,83				D



Sitios	Variable	N	R²	R² Aj	CV
CABA	% semillas producidas	370	0,10	0,09	32,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24836,44	5	4967,29	7,93	<0,0001
Años	21475,75	2	10737,88	17,14	<0,0001
Tratamientos	2361,92	1	2361,92	3,77	0,0529
Años*Tratamientos	808,86	2	404,43	0,65	0,5250
Error	228036,75	364	626,47		
Total	252873,19	369			

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 626,4746 gl: 364

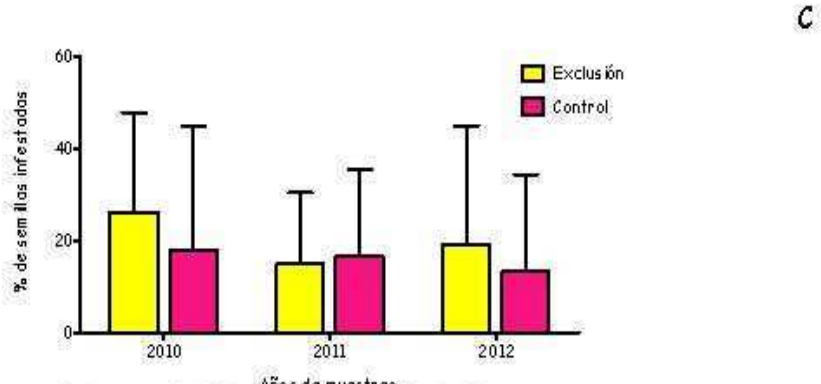
Años	Medias	n	E.E.		
2012	82,60	253	1,57	A	
2010	81,27	19	5,75	A	
2011	65,26	98	2,53		B

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 626,4746 gl: 364

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
Exclusión	80,57	188	3,11	A	
Control	72,19	182	2,99		B

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 626,4746 gl: 364

Años	Tratamientos	Medias	n	E.E.			
2010	Exclusión	89,85	9	8,34	A		
2012	Exclusión	85,15	130	2,20	A		
2012	Control	80,06	123	2,26	A	B	
2010	Control	72,69	10	7,92		B	C
2011	Exclusión	66,70	49	3,58			C
2011	Control	63,81	49	3,58			C



Sitios	Variable	N	R²	R² Aj	CV
CASA	% semillas infestadas	237	0,06	0,04	88,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7703,91	5	1540,78	2,95	0,0133
Años	6450,07	2	3225,04	6,17	0,0024
Tratamientos	31,18	1	31,18	0,06	0,8072
Años*Tratamientos	912,58	2	456,29	0,87	0,4189
Error	120691,17	231	522,47		
Total	128395,09	236			

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 522,4726 gl: 231

Años	Medias	n	E.E.		
2010	42,33	10	7,38	A	
2012	27,77	147	1,90		B
2011	19,39	80	2,56		B

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 522,4726 gl: 231

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
Control	30,48	108	4,11	A	
Exclusión	29,18	129	3,44	A	

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 522,4726 gl: 231

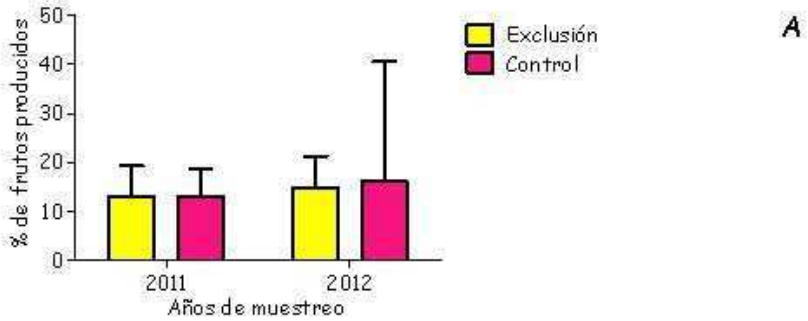
Años	Tratamientos	Medias	n	E.E.			
2010	Control	45,30	4	11,43	A		
2010	Exclusión	39,37	6	9,33	A	B	
2012	Exclusión	30,19	82	2,52		B	C
2012	Control	25,34	65	2,84			C
2011	Control	20,81	39	3,66			C
2011	Exclusión	17,97	41	3,57			C

Figura 5. Producción de frutos y semillas e infestación durante los tres años de experimento en *V. adenantha* en cultivo. A: porcentaje de frutos producidos; n = número de inflorescencias marcadas. B: porcentaje de semillas producidas; n = número de frutos contabilizados. C: porcentaje de semillas infestadas; n = número de frutos contabilizados.

V. candida

No se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento para ninguna de las variables analizadas, pero si se encontraron diferencias significativas entre años para ambas

variables (Figura 6, A, B). Además, para el porcentaje de semillas producidas la interacción entre años y tratamientos fue significativa (Figura 6, B). Por la tanto, la temporada de cultivo influyó en la producción de semillas y la aplicación del tratamiento fue dependiente del tiempo.



Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Frutos producidos	655	0,01	3,5E-03	99,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1130,77	3	376,92	1,77	0,1520
Años	987,13	1	987,13	4,63	0,0318
Tratamientos	35,74	1	35,74	0,17	0,6824
Años*Tratamientos	74,27	1	74,27	0,35	0,5553
Error	138799,54	651	213,21		
Total	139930,31	654			

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 213,2097 gl: 651

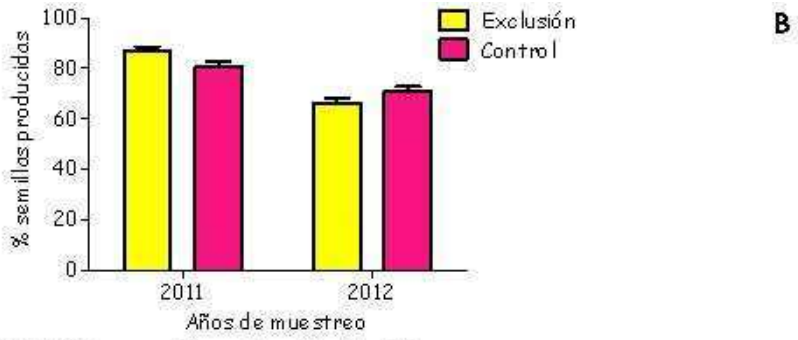
Años	Medias	n	E.E.		
2012	15,60	415	0,72	A	
2011	13,05	240	0,94		B

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 213,2097 gl: 651

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
Control	14,57	324	0,84	A
Exclusión	14,08	331	0,83	A

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 213,2097 gl: 651

Años	Tratamientos	Medias	n	E.E.	
2012	Control	16,19	206	1,02	A
2012	Exclusión	15,01	209	1,01	A
2011	Exclusión	13,16	122	1,32	A
2011	Control	12,95	118	1,34	A



Variable	N	R²	R² Aj	CV
Semillas producidas	597	0,10	0,10	31,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36833,28	3	12277,76	22,58	<0,0001
Años	31852,73	1	31852,73	58,57	<0,0001
Tratamientos	115,81	1	115,81	0,21	0,6446
Años*Tratamientos	4181,31	1	4181,31	7,69	0,0057
Error	322503,45	593	543,85		
Total	359336,73	596			

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 543,8507 gl: 593

Años	Medias	n	E.E.		
2011	83,63	229	1,54	A	
2012	68,60	368	1,22		B

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 543,8507 gl: 593

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
Exclusión	76,56	307	1,37	A
Control	75,66	290	1,41	A

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 543,8507 gl: 593

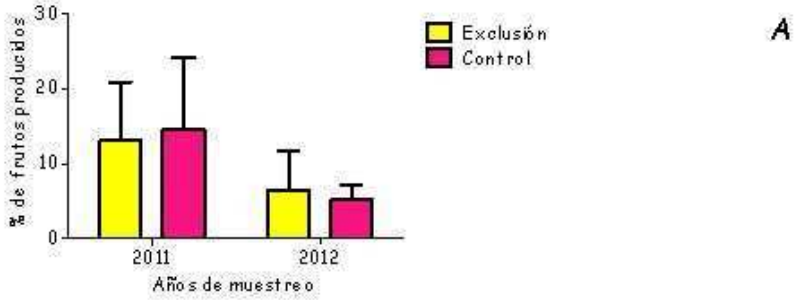
Años	Tratamientos	Medias	n	E.E.			
2011	Exclusión	86,80	119	2,14	A		
2011	Control	80,45	110	2,22		B	
2012	Control	70,87	180	1,74			C
2012	Exclusión	66,33	188	1,70			C

Figura 6. Producción de frutos y semillas durante los dos años de experimento en *V. candida*. A: porcentaje de frutos producidos; n= número de inflorescencias marcadas. B: porcentaje de semillas producidas; n = número de frutos contabilizados.

V. caracalla

Tanto para la producción de frutos como de semillas, se encontraron diferencias significativas entre ambos años (Figura 7, A-B) pero no hubo diferencias entre los tratamientos (control vs. exclusión) ni en la interacción del tiempo con los

tratamientos. Por lo tanto, ocurrió una variación temporal en la producción de frutos y de semillas independiente de la presencia o ausencia de las hormigas.



Variable	N	R²	R² Aj	CV
% de frutos producidos	126	0,29	0,27	69,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2142,34	3	714,11	16,78	<0,0001
Años	2015,78	1	2015,78	47,37	<0,0001
Tratamientos	0,27	1	0,27	0,01	0,9362
Años*Tratamientos	65,23	1	65,23	1,53	0,2181
Error	5191,50	122	42,55		
Total	7333,84	125			

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 42,5533 gl: 122

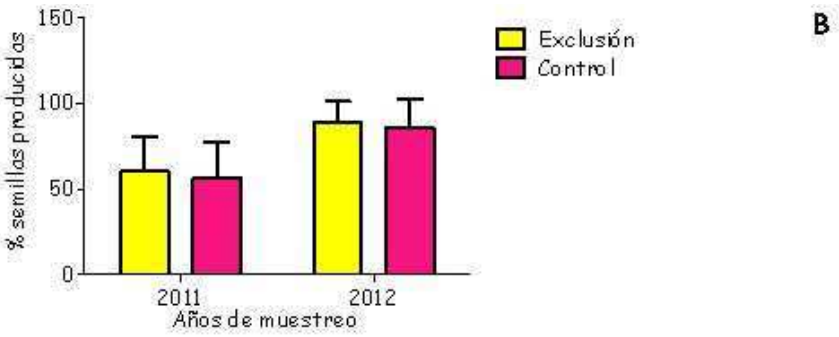
Años	Medias	n	E.E.	
2011	13,87	55	0,88	A
2012	5,78	71	0,77	B

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 42,5533 gl: 122

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
Control	9,87	67	0,80	A
Exclusión	9,78	59	0,86	A

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 42,5533 gl: 122

Años	Tratamientos	Medias	n	E.E.		
2011	Control	14,64	30	1,19	A	
2011	Exclusión	13,10	25	1,30	A	
2012	Exclusión	6,46	34	1,12		B
2012	Control	5,10	37	1,07		B



Variable	N	R²	R² Aj	CV
% semillas producidas	124	0,41	0,39	23,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26138,44	3	8712,81	27,73	<0,0001
Años	25387,49	1	25387,49	80,80	<0,0001
Tratamientos	332,55	1	332,55	1,06	0,3057
Años*Tratamientos	2,63	1	2,63	0,01	0,9273
Error	37705,44	120	314,21		
Total	63843,89	123			

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 314,2120 gl: 120

Años	Medias	n	E.E.	
2012	87,46	70	2,12	A
2011	58,48	54	2,43	B

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 314,2120 gl: 120

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
Exclusión	74,63	57	2,38	A
Control	71,31	67	2,18	A

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 314,2120 gl: 120

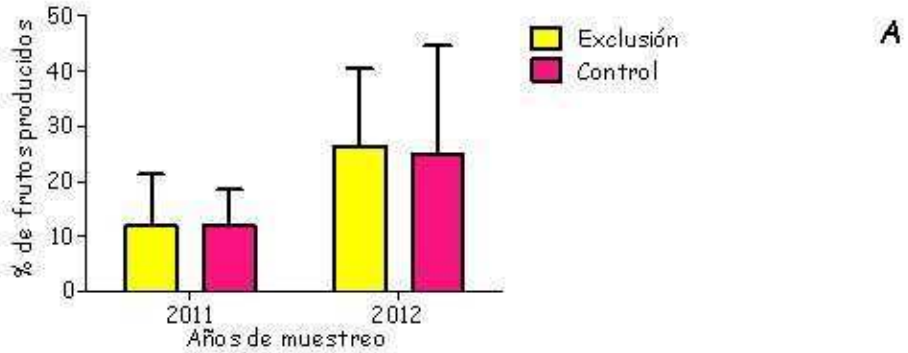
Años	Tratamientos	Medias	n	E.E.		
2012	Exclusión	88,97	33	3,09	A	
2012	Control	85,95	37	2,91	A	
2011	Exclusión	60,28	24	3,62		B
2011	Control	56,67	30	3,24		B

Figura 7. Producción de frutos y semillas durante los dos años de experimento en *V. caracalla*. A: porcentaje de frutos producidos; n = número de inflorescencias marcadas. B: porcentaje de semillas producidas; n = número de frutos contabilizados.

V. luteola

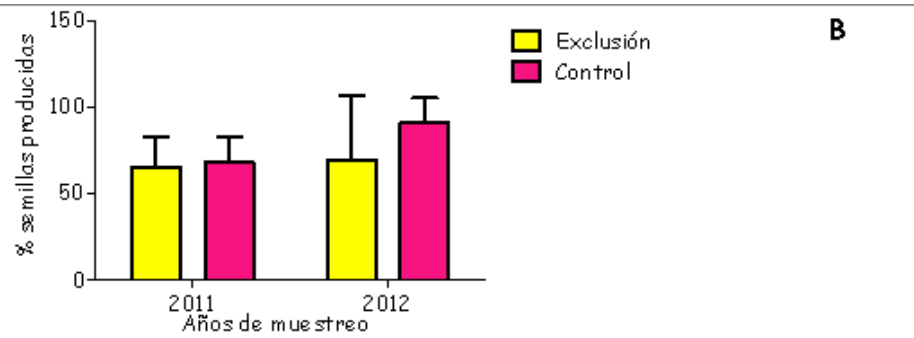
No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (control versus. exclusión) dentro de cada año, pero sí se encontraron diferencias significativas entre los distintos años de cultivo, tanto en la producción de frutos en

ausencia de hormigas como en la producción de semillas tanto en presencia como en ausencia de hormigas (Figura 8, A-B). Esto sugiere una variación temporal en la interacción.



Variable	Años	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
% frutos producidos	2011	Control	10	12,06	6,48	10,77	3	8,71	0,0330
% frutos producidos	2011	Exclusión	10	11,90	9,35	10,56			
% frutos producidos	2012	Control	9	24,85	19,80	16,67			
% frutos producidos	2012	Exclusión	6	26,39	14,08	25,00			

Trat.	Ranks			
2011:Exclusión	13,10	A		
2011:Control	14,30	A	B	
2012:Control	22,33		B	C
2012:Exclusión	25,83			C



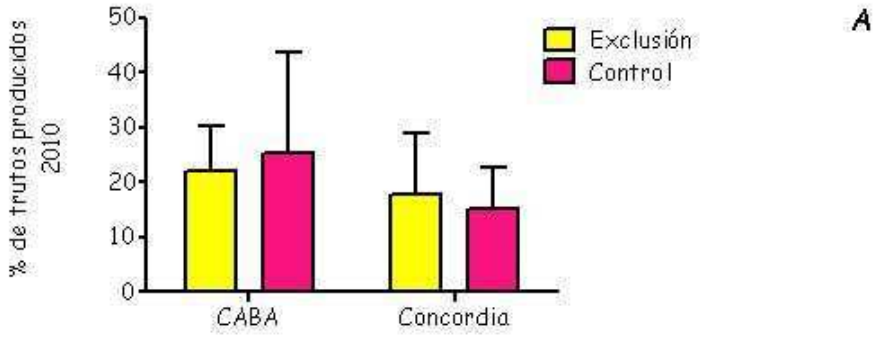
Variable	Años	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
% semillas producidas	2011	Control	10	68,01	14,86	68,19	3	9,55	0,0209
% semillas producidas	2011	Exclusión	10	65,25	18,06	62,50			
% semillas producidas	2012	Control	9	91,28	14,03	100,00			
% semillas producidas	2012	Exclusión	5	69,52	37,02	83,33			

Trat.	Ranks		
2011:Exclusión	13,00	A	
2011:Control	14,30	A	
2012:Exclusión	17,70	A	B
2012:Control	25,94		B

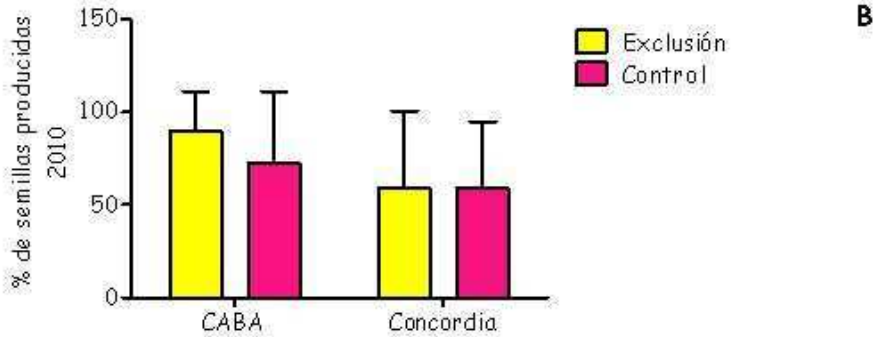
Figura 8. Producción de frutos y semillas durante los dos años de experimento en *V. luteola*. A: porcentaje de frutos; n = número de inflorescencia marcada. B: porcentaje de semillas producidas; n = número de frutos contabilizados.

c) Comparaciones entre sitios

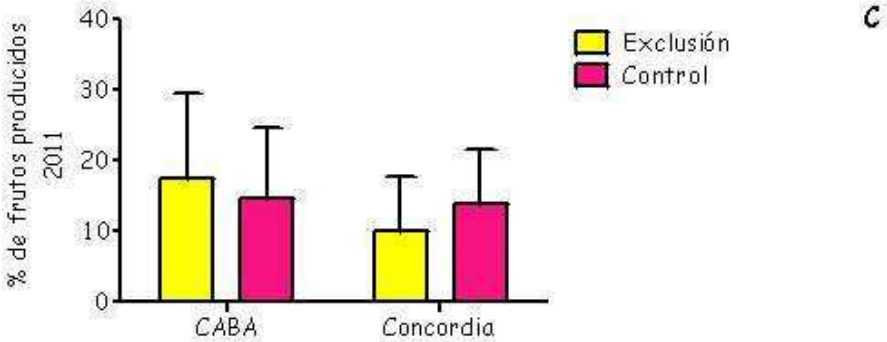
Al comparar los dos años de experimento (2010 y 2011) de *V. adenantha* en los dos sitios (Concordia y Campo Experimental en CABA) (Figura 9, A-D), no se encontraron diferencias significativas para el 2010 en ninguna de las variables analizadas (Figura 9, A, B), mientras que durante 2011 (Figura 9, C, D) se encontraron diferencias entre sitios en el tratamiento de exclusión de las semillas producidas (Figura 9, D); esto demuestra una variación espacial durante esa temporada.



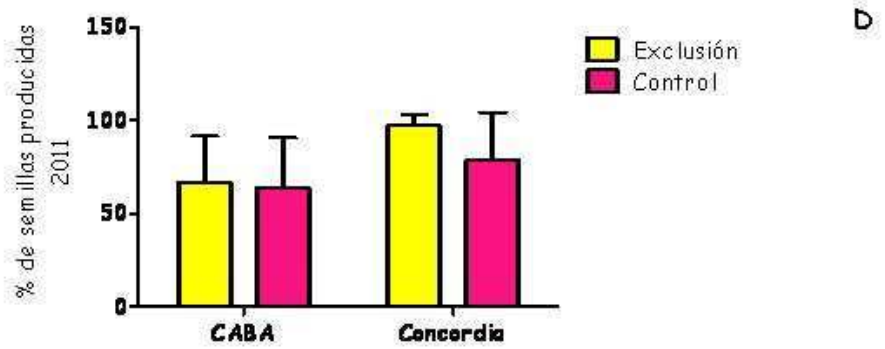
Años	Variable	Sitios	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
2010	% frutos producidos	CABA	Control	10	25,43	18,14	18,75	3	3,70	0,2957
2010	% frutos producidos	CABA	Exclusión	10	21,96	8,32	21,83			
2010	% frutos producidos	Concordia	Control	10	15,03	7,68	16,90			
2010	% frutos producidos	Concordia	Exclusión	9	17,81	11,04	16,67			



Años	Variable	Sitios	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
2010	% semillas producidas	CABA	Control	10	72,69	38,66	93,73	3	4,34	0,1978
2010	% semillas producidas	CABA	Exclusión	9	89,85	22,78	100,00			
2010	% semillas producidas	Concordia	Control	8	59,30	35,76	56,11			
2010	% semillas producidas	Concordia	Exclusión	7	59,01	41,70	80,00			



Años	Variable	Sitios	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
2011	% frutos producidos	CABA	Control	52	14,69	10,07	11,33	3	3,59	0,3094
2011	% frutos producidos	CABA	Exclusión	51	17,50	12,04	13,33			
2011	% frutos producidos	Concordia	Control	4	13,94	7,72	11,81			
2011	% frutos producidos	Concordia	Exclusión	6	10,17	7,59	7,29			



Años	Variable	Sitios	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
2011	% semillas producidas	CABA	Control	49	63,81	26,92	67,71	3	8,45	0,0370
2011	% semillas producidas	CABA	Exclusión	49	66,70	24,77	68,42			
2011	% semillas producidas	Concordia	Control	3	78,57	25,75	85,71			
2011	% semillas producidas	Concordia	Exclusión	4	97,12	5,77	100,00			

Trat.	Ranks		
CABA:Control	49,56	A	
CABA:Exclusión	52,23	A	
Concordia:Control	67,50	A	B
Concordia:Exclusión	93,63		B

Figura 9. Producción de frutos y semillas medidas durante los dos años de experimento en los dos sitios de estudio de *V. adenantha*; A, B: 2010; C, D: 2011. A, C: porcentaje de frutos producidos; n = número de inflorescencias marcadas. B, D: porcentaje de semillas producidas; n = número de frutos contabilizados.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión

Morfología de las semillas y de las plántulas

Las semillas de todas las especies, excepto las de *V. luteola*, tienen una expansión del borde arilar (Corner, 1952), la cual corresponde al tipo de arilo "lengua seca" según la clasificación de Gunn (1981) para algunos taxa de Papilionoideae.

El tamaño y la forma de la semilla, así como la forma del hilo, tienen valor diagnóstico a nivel de especie, de acuerdo con los hallazgos de Alsina (1988) y Paulino *et al.* (2010) en otros géneros de Leguminosae, por lo que se enfatiza la importancia de estos caracteres para su uso en la taxonomía de la familia. Del mismo modo, la superficie del tegumento de todas las especies consiste en costras, de acuerdo a la clasificación de Barthlott (1998); esta variada ornamentación fue aquí utilizada para diferenciar especies en otras

Papilionoideae (Alsina, 1988; Chernoff *et al.*, 1992) y, contrariamente, a lo observado por Azzioui & Es-Sgaouri (1999), esta tesis permitió diferenciar subgéneros y secciones dentro de un mismo género.

Los caracteres de las semillas que contribuyeron a la diferenciación de las especies estudiadas de *Vigna* fueron el ancho, el espesor, la forma, así como la presencia y forma de la expansión del borde arilar y la ornamentación del tegumento. El patrón de coloración también difirió entre especies; de todos modos, esta característica tiene que ser confirmada con el estudio de semillas de poblaciones adicionales de cada especie, ya que la variación en este carácter puede ocurrir dentro de una misma especie, variación ejemplificada en varios géneros de Leguminosae (Werker, 1997), dado que pueden existir distintas expresiones fenotípicas conforme varía la distribución de cada especie. Además, los estudios con MEB permitieron conocer detalladamente la morfología del tegumento así como la transición desde la superficie del tegumento

seminal hacia el borde arilar. Estos resultados son útiles para el reconocimiento de las semillas a nivel específico que a su vez se pueden emplear para en los bancos de germoplasma u otras instituciones vinculadas con el sector agronómico y alimentario.

Los caracteres de las plántulas de las especies estudiadas corresponden a las usuales en Phaseolae enumeradas por Duke & Polhill (1981). Las plántulas de *V. caracalla* y *V. luteola* pueden ser asignadas al tipo *Cinnamomum*, mientras que las de *V. adenantha* y *V. candida* al tipo *Sophora* (Ye, 1983). *V. luteola* está incluida en un subgénero diferente al resto de las especies (Maréchal *et al*., 1981), por lo tanto las características de las plántulas coinciden con la posición infragenérica actual.

La variación infrecuente en la división de la lámina de los protófilos en *V. caracalla* también fue observada en varias especies de *Sesbania* (Veasey *et al.*, 1999). Esto podría tratarse de un caso teratológico. Futuros estudios permitirán corroborar o desestimar esta suposición.

Marechàl *et al*. (1981) mencionaron que el tipo de germinación en el complejo *Phaseolus-Vigna* permite la diferenciación de los géneros involucrados (epígea en *Phaseolus* e hipógea en *Vigna*). En contraste, en las especies aquí examinadas, tanto la germinación faneroepígea (epígea) así como la criptohipógea (hipógea) han sido encontradas dentro de *Vigna*. Duke (1969) observó que muchos géneros presentan especies con ambos tipos de germinación. *V. adenantha y V. candida* incluidas en el subgénero *Sigmoidotropis*, exhibieron germinación faneroepígea (=epígea) mientras que *V. caracalla y V. luteola*, incluidas en los subgéneros *Sigmoidotropis* y *Vigna* respectivamente, presentaron germinación criptohipógea (=hipógea). Por lo tanto, los resultados de esta tesis permiten afirmar que el tipo de germinación no sería útil para diferenciar *Vigna* de *Phaseolus*, menos aún los subgéneros dentro de *Vigna*.

En cambio, la longevidad de las plantas resultó diferente en las especies pertenecientes a distintos

subgéneros, siendo *V. luteola* (subgn. *Vigna*) anual versus el resto (subgn. *Sigmoidotropis*), que son plurianuales y presentan hipocótilo reservante que les permitiría afrontar las etapas desfavorables. Debería ser necesario estudiar este rasgo en más especies de *Vigna* para confirmar si estos caracteres apoyan la subdivisión del género. Por otra parte, el carácter estolonífero presente en *V. adenantha* sería una característica agronómicamente favorable ya que la señalaría como colonizadora potencial en área bajas de zonas intertropicales.

Biología floral y sistema reproductivo

Las flores en *V. adenantha* y *V. candida* tienen estructura, color y recompensas características del tipo estructural papilionoidea (flag-blossom), adaptadas al tamaño medio y grande de las abejas (Faegri and van der Pijl, 1979). El polen es presentado sobre los tricomas estilares y es

depositado en el sector dorsal y lateral de la cabeza, tórax y alas de los polinizadores (noto o pleurotriba), el cual en una visita a otra flor es transferido al estigma contacta los granos de polen llevados ahí. El tipo de transferencia observado en estas especies neotropicales las diferencia de otras paleotropicales o pantropicales, donde la transferencia polínica es esternotriba (Hoc & Ojeda, 2013). Durante la antesis, el mecanismo floral descripto aquí, soporta muchas visitas, como fue observado por Hoc et al. (1993) en *V. longifolia* y Etcheverry (2006) en *V. caracalla*. Este tipo de presentación y transferencia del polen fue interpretado por Endress (1999) como un mecanismo económico de polinización que evolucionó en muchas Papilionoideae. La concentración de néctar coincide con los registros previos para las plantas melitófilas (Cruden et al., 1983) y es constante a lo largo de la antesis. La lluvia o la llovizna no afectan la composición de néctar o el polen, porque la quilla y el tubo estaminal los protegen, en concordancia con

las observaciones en *Phaseolus augusti* y *P. vulgaris* var. *aborigineus* (Hoc & Amela, 1998; 1999). La antesis ocurre durante el mismo período del día en ambas especies y comparten los mismos polinizadores (*X. augusti*, *Centris* sp. y *B. atratus*), pero la polinización interespecífica no ocurre; esto se debe a que, la quilla en *V. adenantha* está girada a la izquierda formando varios giros (270º) y en *V. candida* está girada a la derecha adquiriendo un aspecto sigmoideo, por lo tanto el ala que baja es diferente según dónde se pose el polinizador y como consecuencia de ello, el polen es transferido como manchas en diferentes lados del dorso o pleuras toráxicos del polinizador. Puede ser deducido que si existe alguna compatibilidad genética entre las dos especies, la hibridación no es posible, coincidiendo con la aseveración de Endress (1999) que ocurre aislamiento genético (específico) en las flores de Papilionoideae asimétricas. La morfología floral para diferenciar Subgéneros y Secciones dentro del género (Palacios y Hoc, 2001; Maréchal et al., 1981)

indican las sorprendentes vías evolutivas que se desarrollaron durante el proceso de especialización de los taxones que en muchos casos crecen en simpatría.

En las especies estudiadas aquí el robo de polen o el néctar ocurre, pero no afecta la oferta de recompensa como observaron Hoc et al. (1993).

La fragancia emitida en *V. candida* actúa como un atractivo secundario para los polinizadores.

Los resultados del tratamiento de autogamia espontánea en *V. candida* demuestran que la proximidad de los granos de polen presentados cerca del estigma no implica que la autopolinización espontánea devenga en la producción de semillas, por lo tanto, *V. candida* es autoincompatible, y la acción de un visitante que cruce diferentes plantas es necesaria para la producción de semillas. Los resultados del tratamiento de autogamia inducida realizado aquí confirman esta afirmación.

En cambio, *V. adenantha* es autocompatible, ya que se produjeron semillas luego de los tres

tratamientos. Sin embargo, se obtuvieron menos semillas por autogamia espontánea, quizás porque la proximidad de los pelos del cepillo con los granos de polen no garantiza una transferencia eficiente al estigma sin la activación del mecanismo de polinización. La mayor producción de semillas originada por autogamia inducida podría deberse a una limitación de polinizadores en el área de estudio.

Tanto *V. caracalla* como *V. luteola* al igual que *V. adenantha* son autocompatiles (Etcheverry, 2008; Agulló *et al.*, 1993); estos resultados demuestran que la presencia del polinizador favorece el éxito reproductivo, a diferencia de lo observado por Etcheverry (2008). Si bien en *V. luteola* también se observó un alto porcentaje de frutos y semillas en la polinización libre habría que realizar más experimentos para determinar su efectividad.

Otra característica interesante para señalar en *V. luteola* es la actividad que realizan las abejas del género *Megachile*, reportadas como polinizadoras

por Agulló *et al.* (1993); en el cultivo, además de este rol, actuaron como fitófagos, ya que cortaron segmentos circulares de las hojas, las cuales empleaban en la elaboración de los nidos (Genaro, 1996).

Disposición, morfología, anatomía y ontogenia de los NEFs

Los NEFs de las cuatro especies analizadas se originan de la abscisión de una yema floral que interrumpe su desarrollo; esta abscisión se lleva a cabo de diferentes maneras; a diferencia de lo que sucede en *V. adenantha* donde las piezas se caen en forma secuencial, o sea, primero se cae la bráctea tectriz y luego las bractéolas junto con la yema floral, en *V. luteola* tanto la bráctea tectriz como las bracteolas y la yema floral caen simultáneamente, sin embargo, en *V. candida* y *V. caracalla*, las bracteolas están ausentes por lo tanto

se observa la caída sólo de la bráctea tectriz y posteriormente la caída de la yema floral.

La pérdida de las bractéolas es considerada un carácter nuevo (apomórfico) dentro en la escala evolutiva de las Papilionoideae y fue registrado en diez especies de los 30 taxones pertenecientes a 15 tribus durante estudios ontogenéticos de las flores (Prenner, 2004), por lo tanto sería interesante tener en cuenta lo hallado en esta tesis a los fines de estructurar la subdivisión genérica.

El origen de los NEFs asociados con las inflorescencias originados a partir de las yemas florales abortivas fue sugerido para otras Leguminosae (Ojehomon, 1968; Tucker, 1987; 2003). El cese de la actividad meristemática y el desprendimiento de la yema floral en desarrollo fue también observado en *Macroptilium* (Díaz Castelazo *et al.*, 2005). Por lo tanto, como estos nectarios se originan de la abscisión de un órgano en desarrollo, en este caso una flor abortiva, formándose un promontorio elevado alrededor de la cicatriz de

abscisión, podrían ser incluidos en el tipo "Hochnektarien" (nectarios elevados) de acuerdo a la clasificación propuesta por Zimmerman (1932) y aceptada por Elías (1983). Cabe aclarar que se considera yema floral a la estructura que aborta dado que se observaron los primordios de sépalos en coincidencia con lo descripto por Tucker (1987; 2003) y Ramirez-Domenèch & Tucker (1988) en varias Leguminosae en la ontogenia floral.

Ojehomon (1968) analizó el desarrollo de los NEFs en *V. unguiculata* describiéndolos como "cushion units", pero desechando que estas estructuras fueron NEFs, sino infiriendo que la secreción es el resultado de la excreción de productos celulares. Posteriormente, Kuo & Pate (1985) describieron los NEFs del eje secundario de la inflorescencia de *V. unguiculata* como una estructura compuesta formada por varias subunidades secretoras sin aclarar si están activas al mismo tiempo, observando que cada una de ellas estaba formada por un parénquima secretor cuya

producción (néctar más restos celulares) era eliminada a través de un orificio rodeado por un anillo constituido por epidermis y parénquima. Los resultados de esta tesis concuerdan con los estudios ontogenéticas de Ojehomon (1968) pero no con el rol que éste propuso, tampoco concuerdan con las observaciones de Kuo & Pate (1985) en cuanto a que se comprobó que cada NEF se origina independientemente de un eje secundario y alcanza el estadio secretor en diferentes momentos siguiendo una secuencia acrópeta. En las especies estudiadas y de acuerdo a esto, a partir del inicio de la primera yema floral de cada nudo hasta la maduración de los frutos que devienen de ella hay siempre un NEF en secreción activa (estadio 3), al igual que lo que ocurre en otras Leguminosae (Pate *et al.*, 1985; CAB, 2004), a excepción de *V. luteola*, donde la secreción, del único nectario activo cesa durante la antesis, por lo tanto cuando la fructicación ocurre ya no hay ningún nectario activo.

Al igual que en *V. unguiculata* (Kuo & Pate, 1985), los NEFs de las especies estudiadas aquí son del tipo elevado. Kuo & Pate (1985) observaron estomas en la periferia de los nectarios, a través de los cuales fluía el néctar, por lo que el tipo de secreción en este caso sería ecrina; sin embargo, este mecanismo no se corroboró en ninguna de las especies aquí estudiadas, en las cuales, debido a la presencia tanto en el anillo como en las células centrales de invaginaciones (tanto en las células centrales como en las del anillo) en la plasmalema, numerosas vesículas, dictiosomas, retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias, el tipo de secreción se ajusta a la secreción granulocrina, la cual sería acorde a la manera sugerida por Fahn (1979. Las células con invaginaciones actúan como células transfer (Gunning and Pate, 1969; Offler *et al.*, 2002; Zheng & Wang, 2010), desde donde el néctar se mueve a través de la pared hacia los espacios subcuticulares.

En *V. adenantha*, *V. candida* y *V. caracalla* se observó que, tanto el anillo como las células centrales secretan, mientras que en *V. luteola*, al igual que en *V. unguiculata* (Kuo & Pate, 1985), la actividad secretora está más concentrada en las células centrales. Es interesante notar esto, ya que *V. candida*, *V. caracalla* y *V. adenantha* pertenecen al mismo subgénero (*Sigmoidotropis*), mientras que *V. unguiculata* y *V. luteola* están incluídas en otro subgénero (*Vigna*) (Marechal *et al.*, 1978). Por lo tanto, la histología del estadio secretor podría soportar este tratamiento taxonómico.

Respecto de la vascularización de los NEFs, ésta puede variar entre especies del mismo género (Frei, 1955 citado en Fahn, 1979). Kuo & Pate (1985) señalaron que la vascularización en *V. unguiculata* está solamente constituida por floema; contrariamente, en las especies estudiadas en esta tesis, los haces que inervan los NEFs están formadas por floema y xilema, como es usual en nectarios elevados (Zimmerman, 1932; Elias, 1983).

Es de interés resaltar que en esta tesis se hace mención por primera vez que existe una correlación entre el desarrollo de los NEFs asociados a las inflorescencias con la microgametogénesis y la megagametogénesis de las flores que se desarrollan en el mismo nudo, por lo tanto, cuando se produce la antesis en cada eje secundario, el primer nectario formado está activo, con la excepción de *V. luteola*, en las otras existe protección potencial de los frutos.

Análisis de la interacción NEFs-Visitantes

El ensamble de hormigas en *V. adenantha* y *V. caracalla* en las observaciones preliminares estaba conformado por *Camponotus mus*; hormigas de este género fueron observadas por Di Stilio *et al.* (1991) y Etcheverry *et al*. (2005) en estas especies de *Vigna* en las mismas áreas geográficas.

Con relación a *V. luteola* los resultados de esta tesis difieren de aquellos obtenidos por otros autores ya que aquí se registró a *L. humile* y *Solenopsis* sp. recorriendo las inflorescencias, mientras que Agulló *et al.* (1993), Gamba *et al.* (2000), Koptur (1992a) y Koptur *et al.* (2010) registraron individuos de *Camponotus* sp. en las mismas y en otras áreas de estudio.

Variaciones similares se registraron en los presentes resultados respecto de las propias observaciones previas en *V. adenantha*. Durante las dos temporadas de muestreo en Concordia, se registró el patrullaje de *C. mus*, a diferencia del registro en esta especie de planta en el cultivo en Ciudad Universitaria (CABA), donde la única especie registrada fue *L. humile*.

Los resultados preliminares también difieren de los ensayos definitivos tanto en *V. candida* como en *V. caracalla*, donde se observó a *C. mus* en los ensayos preliminares y a *L. humile* en los definitivos.

Durante el cultivo, en *V. luteola*, al igual que en las observaciones preliminares, también se observaron especímenes de *L. humile*, pero éstas no se hallaban simultáneamente con *Solenopsis* sp.

Respecto a la actividad de los formícidos, excepto en las observaciones preliminares de *V. candida*, donde las hormigas espantaban a los polinizadores, en ninguna otra especie analizada se observó esta actividad, coincidiendo con las menciones de Di Stilio *et al.* (1991), Agulló *et al.* (1993), Gamba *et al.* (2000) y Etcheverry et al. (2005). Por otro lado, en concordancia con las observaciones realizadas por Koptur (1992a) y Koptur *et al.* (2010) en *V. luteola* y por Hoc *et al.* (1993) en *V. longifolia,* donde las hormigas interferían con la actividad de los fitófagos, sólo en *V. candida* se registraron hormigas desplazando a coleópteros florívoros.

A pesar de estas diferencias comportamentales, al analizar los resultados de los experimentos de exclusión se determinó que la presencia de las

hormigas no influyó en el éxito reproductivo de ninguna de las especies de plantas estudiadas respecto a la producción de frutos y semillas; aún más, en ninguna de las poblaciones de *V. adenantha* analizadas. Con lo cual se podría afirmar que los formícidos no ejercieron un rol protector en estas especies de plantas en los sitios y temporadas de estudio, y por lo tanto estaríamos en presencia de un mutualismo laxo, según la definición de del Val & Dirzo (2004).

Tampoco se evidenció protección respecto a la infestación por brúquidos en *V. adenantha*, ya que esta ésta no varió en presencia o ausencia de las hormigas, coincidiendo con las observaciones de Ruhren (2003) en otras Leguminosae. Además de en *V. adenantha*, De la Cruz Pérez *et al.* (2013) también observaron la infestación por brúquidos en *V. caracalla* y *V. luteola* sin cuantificarlo, especies en las cuales no registramos esta infestación, pero sí se encontró un fruto de *V. candida* infestado, siendo esta la primera vez que se registra este tipo de

interacción entre estos coleópteros y esta especie de planta.

Los resultados aquí obtenidos en *V. luteola* difieren de lo analizado por Koptur (1992a) y Koptur *et al.* (2010), quienes señalaron que esta especie de planta presentaría un mutualismo intermedio con las hormigas (del Val & Dirzo, 2004), pero es necesario tener en cuenta que arribaron a estas conclusiones a partir de observaciones de campo y no de experimentos de exclusión.

Durante los años de muestreo en el cultivo, en todas las especies se observaron variaciones temporales y en la comparación de las poblaciones de *V. adenantha* entre el cultivo y Concordia existieron variaciones espaciales respecto a la exclusión durante 2011. Esto podría deberse a factores abióticos (climáticos), como hicieron notar Koptur (1985, 1992b) y Kersch & Fonseca (2005); o bien a factores bióticos, como la presencia de cochinillas y áfidos, que distraen a las hormigas hacia otras fuentes de líquidos azucarados (Buckley, 1983;

Delabie & Fernández, 2003); las diferencias también pueden asignarse al estado general de las plantas, a la abundancia relativa de los formícidos y/o los herbívoros (Rudgers & Strauss, 2004) y/o a la distancia desde sus nidos (Bentley, 1977a; Mckey, 1989; Koptur, 1992b).

V. candida fue la única especie en la que la interacción dio significativa en consecuencia se podría determinar que la temporada de cultivo (factores abióticos, específicamente climatológicos) influyó en la producción de semillas, por lo tanto la aplicación del tratamiento fue dependiente del tiempo.

Conclusiones

1. La morfología de las semillas, el tipo de germinación, el patrón de crecimiento de las plántulas hasta el primer año de desarrollo y la longevidad de las plantas, así como la presencia de hipocótile reservante en las especies plurianuales, desconocido hasta el presente, contribuyen al tratamiento taxonómico, sistemático y agronómico del género.

2. Debido al patrón de crecimiento, fenología, las características florales aquí estudiadas, sumadas a la capacidad de nitrificación previamente citada, las especies examinadas pueden ser empleadas además de forrajeras como ornamentales en áreas cálidas o templadas, aún en tierras anegables, implementando de esta manera el aprovechamiento de un recurso nativo.

3. Se comprobó que existe autocompatibilidad en *V. adenantha, V. luteola y V. caracalla*, hecho que permite la producción de frutos en condiciones de aislamiento; contrariamente, en *V. candida* existe autoincompatibilidad, por lo tanto, al implementar cultivos, se debe considerar la plantación de los ejemplares dispuestos en forma próxima con el objeto de que los polinizadores lleven a cabo la polinización cruzada.

4. El conocimiento de los polinizadores en las especies estudiadas es útil a nivel agronómico, ya que permite indicar cuáles serían necesarios para estas especies en distintas áreas de cultivo. Particularmente, en *V. luteola*, debido a su hábito ruderal, fue importante conocer que distintos visitantes florales y distintos ensambles de hormigas interactúan con las plantas en los diferentes hábitats que éstas ocupan.

5. Los NEFs de *V. adenantha*, *V. candida*, *V. caracalla* y *V. luteola* se generan a partir de flores

abortivas, son del tipo elevado Y presentan secreción granulocrina. La cantidad, disposición y estructura de los mismos puede contribuir a la taxonomía.

6. En las cuatro especies, cada NEF está constituido por la cicatriz que deja la yema floral en desarrollo al caer más un anillo. El anillo prolifera a partir del eje secundario portador de flores y de NEFs.

7. Se comprobó por primera vez que, en las especies estudiadas, la ontogenia del primer o del único NEF funcional, según de que especie se trate, está coordinada con la microesporogénesis y megaesporogénesis, así como con la microgametogénesis y la megagametogénesis, determinándose que el primer o único NEF funcional culmina su desarrollo cuando tanto los granos de polen como los sacos embrionarios están completamente formados y las flores comienzan a abrirse.

8. A excepción de *V. luteola*, donde la secreción del único nectario funcional cesa durante la antesis, en las demás especies la secreción es activa desde la apertura de las flores hasta la maduración de los frutos, dado que en cada eje secundario se genera más de un nectario funcional y su maduración es progresiva; este hecho permite inferir que la actividad de los NEFs estaría relacionada con la producción de una defensa biológica indirecta por la cual las hormigas ejercerían cierta protección a las flores y los frutos frente al ataque de los florívoros, fitófagos, frugívoros y/o predadores de semillas. Sin embargo, la presencia de los NEFs en estas especies no constituyó una forma biológica de control en los sitios y temporadas de estudio, ya que las hormigas que los visitaron solamente consumieron el néctar, sin incidir en un incremento de la producción de frutos ni de semillas, conformando un mutualismo laxo.

9. La identidad de los formícidos varió entre sitios (entre poblaciones naturales y el cultivo), tanto para la misma como para distintas temporadas, para cada una de las especies de Vigna, por lo tanto, ocurrió variación espacial en la asociación entre Vigna spp. y los libadores de sus NEFs.

10. La identidad de los formícidos no varió en el cultivo entre distintas temporadas para cada especie de Vigna, ni para V. adenantha en Concordia, por lo tanto, no ocurrió variación temporal para un mismo sitio en la asociación entre Vigna spp. y los libadores de sus NEFs.

11. La producción de frutos y de semillas, en una misma temporada de cultivo, no difirió en presencia o ausencia de hormigas, en ninguna de las especies de Vigna; en consecuencia, las hormigas no influyeron en el éxito reproductivo de Vigna spp.

12. La producción de frutos y de semillas, tanto en presencia como en ausencia de hormigas,

varió temporalmente, en la mayoría de las especies de Vigna, excepto en V. adenantha en Concordia, y espacialmente en V. adenantha; en consecuencia, el éxito reproductivo varió entre temporadas y entre sitios independientemente del patrullaje de las hormigas.

13. En síntesis, las variaciones espaciales (en la identidad de las hormigas) y temporales (en el éxito reproductivo en presencia o ausencia de las hormigas) corroboran que la interacción entre las especies de Vigna con los libadores de sus NEFs constituye un mutualismo laxo; el éxito reproductivo de las especies de Vigna dependería también de otros factores, como las condiciones meteorológicas, presencia de fitófagos, agresividad de cada taxón de hormigas, abundancia relativa de los taxones intervinientes.

BIBLIOGRAFÍA

Agulló, M.A., Brizuela, M.M., Hoc, P.S., Di Stilio, V.S., Palacios, R.A., Genise, J. & Hazeldine, P. 1993. Relación unidad de polinización-visitantes florales en *Vigna luteola* (Leguminosae, Phseoleae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 29: 131-138.

Ahmed F.E., Mutters, R.G. & Hall, A.E. 1993. Interactive effects of high temperature and light quality on floral bud development in cowpea. Australian Journal Plant Physiology 20: 661-667.

Ahmed, F.E., Hall, A.E. & DeMason, D.A. 1992. Heat injury during floral development in cowpea (*Vigna Unguiculata,* Fabaceae). American Journal of Botany 79:784-791.

Alsina, M. 1988. Estudio morfológico y anatómico de las semillas del género Ornithopus L. (Fabaceae). Acta Botánica Malacitana 13: 171-178.

Anderson, G.J. & Symon, D.E. 1985. Extrafloral nectaries in Solanum. Biotropica 17: 40-45.

Azzioui, O. & Es-Sgaouri, A. 1999. Étude du tegument des graines du genre *Genista* L. (Fabaceae) au maroc. Acta Botanica Malacitana 24: 43-51

Barthlott, W., Neinhuts, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I. & Wilhelmi, H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Botanical Journal of the Linnean Society 126: 237-260.

Begon, M., Harper J.L. & Townsend, C.R. 1988. Ecología, individuos, poblaciones y comunidades. Ediciones Omega S.A., Barcelona, 886 pp.

Bentley, B. 1977a. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. Annual Review of Ecology and Systematics 8: 407-427.

Bentley, B. 1977b. The protective function of ants visiting the extrafloral nectarines of Bixa orellana (Bixaceae). Journal of Ecology 65: 27-38.

Beyra, A. & Reyes Artiles, G. 2004. Revisión taxonómica de los géneros *Phaseolus* y *Vigna*

(Leguminosae-Papilionoideae) en Cuba. Anales del Jardín Botánico de Madrid 61(2): 135-154.

Boelcke, O. 1946. Estudio morfológico de las semillas de leguminosas Mimosoideas y Cesalpinioideas de interés agronómico en Argentina. Darwiniana 7: 240-321

Bhattacharyya, B. & Maheshwari, J.K. 1971. Studies on extrafloral nectaries of the Leguminales. Proceeding of the Indian National Science Academy 37: 1-30.

Brizuela, M.M., Hoc, P.S., Di Stilio, V.S., Agullo, M.A. & Palacios, R.A. 1993. Biología floral de *Macroptilium bracteatum* (Leguminosae, Phaseoleae). Darwiniana 32: 41-57.

Buckley, R. 1983. Interaction between ant and membracid bugs decreases growth and seed set of host plant bearing extrafloral nectaries. Oecologia 58:132–136.

CAB. 2004. *Acacia colei*. Forestry Compendium. Datasheets. CAB, UK.

Cabrera, A.L. 1976. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Tomo II: Regiones fitogeográficas argentinas. ACME, Buenos Aires.

Capitaine, L. 1912. Les graines des Légumineuses. Larose-Lechevalier, Paris.

Caspary, R. 1848. De nectaries. Elverfeld, Bonn.

Compton, R.H. 1912. An investigation of the seedling structure in the Leguminosae. The Journal of the Linnean Society (Botany) 41: 1-122.

Corner, E. 1951. The Leguminous seed. Phytomorphology 1: 117-150.

Corner, E. 1976. The seeds of Dicotyledons. Vol. I. Cambridge University press, Madingley Road, Cambridge, England.

Cruden, R.W., Hermann, S.M. & Peterson, S. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. En: B. Bentley, and T. Elias (eds.). The Biology of Nectaries. Columbia University Press. New York pp. 80-125.

Chernoff, M., Plitmann, U. & Kislev, M.E. 1992. Seed characters and testa texture in species of the *Vicieae*: their taxonomic significance. Israel Journal of Botany 41: 167-186.

D'Ambrogio A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Buenos Aires, Hemisferio Sur

De Candolle, A. 1825. Mémoires sur la Famille des Légumineuses. A. Belin, París.

De la Cruz Pérez, A., Romero Nápoles. J., Carrillo Sánchez, J.L., García López, E., Grether Gonzales, R., Sánchez Soto, S. & Pérez de la Cruz, M. 2013. Brúquidos (Coleoptera: Bruchidae) del estado de Tabasco, México. Acta Zoológica Mexicana 29: 1-95

De Souza Maia, M., Maia, F.C. & Pérez, M.A. 2006. Bancos de semillas en el suelo. Agriscientia 23: 33-44.

del Val, E.K. & Dirzo, R. 2004. Mirmecofilia: las plantas con ejército propio. Inteciencia 29: 673–679.

Delabie, J.H.C. & Fernández, F. 2003. Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical. En Fernández F. (ed.) Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. XXVI p. 398.

Delgado-Salinas, A., Bruneau, A. & Doyle, J.J. 1993. Chloroplast DNA phylogenetic studies in the New World Phaseolinae (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). Systematic Botany 18: 6–17.**Delgado-Salinas, A., Bibler, R. & Lavin, M.** 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. Systematic Botany 31: 779–791.

Delgado-Salinas, A., Thulin, M., Pasquet, R., Weeden, N. & Lavin, M. 2011. *Vigna* (leguminosae) sensu lato: the names and identities of the american segregate genera. American Journal of Botany 98: 1694–1715.

Delpino, F. 1875. Rapporti tra insetti e tra nettarii estranuziali in alcune piante. Bollettino della Societa Entomologica Italiana. 7: 69–90.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Di Stilio, V., Agulló, M.A., Brizuela, M.M., Hoc, P.S. & Palacios, R.A. 1991. Relación unidad de polinización-visitantes florales en *Vigna adenantha*. XXIII Jornadas Argentinas de Botánica. Bariloche, Argentina. 14-18/X. Resúmenes: 21.

Díaz Castelazo, C., Rico Gray, V., Oliveira, P.S. & Cautle, M. 2004. Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: richness, ocurrence, seasonality and ant foraging patterns. Ecoscience 11: 472-481.

Díaz-Castelazo, C., Gray-Rico, V., Ortega, F. & Ángeles, G. 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico. Annals of Botany 96: 1175-1189.

Dottori, N.; Bruno, Gloria & Cosa, M.T. 2000. Anatomía comparada de las plántulas de Solanum elaeagnifolium y Solanum juvenale (Solanaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 35: 115-123.

Duke JA. 1969. On tropical tree seedlings. 1. Seeds, seedlings, systems and systematics. Annals of the Missouri Botanical Garden 56: 125–161.

Duke, J.A. & Polhill, R.M. 1981. Seedlings of Leguminosae. In Polhill, R.M & Raven, P.H. (eds). Advances in Legume Systematics. II, The Royal Botanic Gardens, Kew pp. 941-949.

Durkee, L.T., Haber, M.H., Dorn, L. & Remington, A. 1999. Morphology, ultastructure, and function of extrafloral nectaries in three species of Caesalpiniaceae. Journal Iowa Academic Science 106: 82-88.

Elias, T.S. 1983. Extrafloral nectarines: their structure and distribution. In: Bentley, B. & Elias T.S. (eds.). The biology of nectarines. Columbia University Press, New York pp. 175-203.

Endress, P.K. 1999. Symmetry in flowers: diversity and evolution. International Journal of Plant Sciences 160: 3–23.

Etcheverry, A.V., Pérez de Bianchi, S.M., Martín Montiel de López, D. 1999. Floral biology of *Macroptilium erythroloma* (L.) Urban (Fabaceae). Beiträge zur Biologie der Pflanzen 71: 1–16.

Etcheverry, A.V., Pérez de Bianchi, S.M., Martín Montiel de López, D. 2001. Reproductive biology in the amphicarpic legume *Macroptilium panduratum* (Fabaceae, Papilionoideae). Beiträge zur Biologie der Pflanzen 72: 181–197.

Etcheverry, A.V. 2005. Biología reproductiva de *Vigna caracalla* (Fabaceae). PhD Thesis. FCEN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Etcheverry, A.V., Alemán, M.M., Figueroa Fleming, T. 2008. Flower morphology, pollination biology and mating system of the complex flower of *Vigna caracalla* (Fabaceae: Papilionoideae). Annals of Botany 102:305-316.

Etcheverry, A; Gomez, C y Aleman, M. 2008. El rol de los nectarios extraflorales en la defensa de las especies nativas de *Vigna*. III Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad. Buenos Aires.

Faegri, K & van Der Pijil, L. 1979. The Principles Pollinations Ecology. Pergamon Press. Oxford, New York.

Fahn, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London, UK.

Fahn, A. 1987. The extrafloral nectaries of *Sambucus nigra*. Annals of botany 60: 299-308.

Faigón Soverna, A. 2002. Estudios embriológicos en la subtribu *Phaseolinae* (Leguminosae). PhD, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Faigón Soverna, A. Galati, B. Hoc, P.S. 2003. Study of ovule and megagametophyte development in four species of subtribe Phaseolinae (Leguminosae). Acta Biologica Cracoviensia Serie Botanica 45:57-67.

Fernández, JG, Benítez, CA, Picio, RM & Royo Pallares, O. 1988. Leguminosas forrajeras nativas del este de la provincia de Corrientes. Serie técnica Nº 26. EEA Mercedes INTA.

Francino, D.M.T., Sant´Anna-Santos, B.F., Silva, K.L.F., Thadeo, M., Meira, R.M.S.A. & Azevedo, A.A. 2006. Anatomia foliar e caulinar de *Chamaecrista Trichopoda* (Caesalpinioideae) e histoquímica do nectário extrafloral. Planta Daninha, Vinosa-MG 54:695-705.

Gamba, C., Navarro, L.E., Sarraceno, M. & Simonetti, E. 2000. Sistema reproductivo de *Vigna luteola* (Leguminosae, Phaseolae) en el Refugio Natural Educativo de la Ribera norte. Monografía para la asignatura "Elementos de Biología floral", FCEyN, UBA.

Genaro, J.A. 1996. Plantas usadas por abejas de género *Megachile* para construir las celdillas de sus nidos (Hymenoptera: Megachilidae). Caribbean Journal of Science 32: 365-368.

Gianaccini, F., Scaramuzzino, R. & Requesens, E. 2009. Banco de semillas en ambientes de las sierras de Azul (Buenos Aires, Argentina) con distinta intensidad de disturbios. Agriscientia 26: 71-79.

Gopinathan, M.C. & Babu, C.R. 1987. Breeding systems and pollination in *Vigna minima* (Leguminosae, Papilionoideae). Plant Systematics and Evolution 156: 117-126.

Gunn, Ch. 1981. Seeds of Leguminosae. In: Polhill. M. and Raven P. (eds.). Advances in Legume Systematics. Royal Botanic Garden. Kew, England, Vol. II: 913-925.

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

Hedström, I. & Thulin, M. 1986. Pollination by a hugging mechanism in *Vigna vexillata* (Leguminosae,

Papilionoideae). Plant Systematic and Evolution 154: 275-283.

Hoc, P.S., Di Stilio, V., Agulló, M.A., Brizuela, M.M., Palacios, R.A., Hazeldine, P. & Genise, J.F. 1993. Biología floral de *Vigna longifolia* (Leguminosae, Phaseoleae) Darwiniana 32: 27-39.

Hoc, P.S. & Amela García, M.T. 1998. Floral biology and reproductive system of Phaseolus augusti (Fabaceae). Beitr. Biologie d. Pflanzen/ Duncker & Humblot 70: 121-140.

Hoc, P.S. & Amela García, M.T. 1999. Biología floral y sistema reproductivo de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Fabaceae). Revista de Biología Tropical 47:53-61.

Hoc, P.S., Drewes, S.I. & Amela García, M.T. 2003. Biología floral, sistema reproductivo y éxito reproductivo de *Macroptilium fraternum* (Fabaceae). Revista de Biología Tropical 51: 369-380.

Hoc. P. S. 2005. Fabaceae, Tribu Ingeae, en A. M. Anton & F.O. Zuloaga (eds.). PROFLORA. Flora Fanerogámica Argentina 93: 3-24.

Hoc, P.S.; Palacios, R.A. & Mom, M.P. 2007. Novedades en especies de *Vigna* e *Inga* (Leguminosae) para la Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 41: 331-332.

Hoc, P.S. & Ojeda, F.S. 2013. Two *Vigna* species native to Argentina with ornamental potential. Acta Hort. (ISHS) 1000:83-90

Hölldobler,B. & Wilson, E.O. 1990. "The Ants". Springer, Berlin pp. 732.

Hossaert-McKey, M., Orivel, J., Labeyrie, E. Pascal, L. Delabie, J. H. C. & Dejean, A. 2001. Differential associations with ants of three co-occurring extrafloral nectary-bearing plants. Ecoscience 8: 325-335.

Howe, H.F. & Westley, L.C. 1988.Ecological relationships of plants and animals. Oxford University Press. Oxford, New York.

Hurrell, J.A., Ulibarri, E.A., Puentes, J.P., Buet Costantino, F., Arenas, P.M. & Pochettino, M.L. 2001. Leguminosas medicinales y alimenticias utilizadas en la conurbación Buenos Aires-La Plata, Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10: 443-455.

Inouye, D.W. 1980. The terminology of floral larceny. Ecology 61: 1251–1253.

Izaguirre, P. 2005. Uruguay y sus recursos filogenéticos en leguminosas. Agrociencia 9: 77-83.

Jaaska, V. 2001. Isoenzyme diversity and phylogenetic relationships among the American beans of the genus *Vigna* Savi (Fabaceae). Biochemical Systematics and Ecology 29: 1153–1173

Jain, HK & Mehra, KL. 1980. Evolution, adaptation, relationships and uses of the species of *Vigna* cultivated in India. En: Summerfield, R.J. & Bunting, A.H. (eds.). Advances in Legume Science. Royal Botanical Gardens, Kew, UK, pp. 459-468.

Juan, R., Fernández, I. & Pastor, J. 1998. Aportación a la morfología y anatomía de frutos y semillas del género Digitales L. en el suroeste de España. Lazaroa 19: 17-28.

Kandus, P., N. Morandeira & F. Schivo. 2010. Bienes y Servicios Ecosistémicos de los Humedales del Delta del Paraná. En Kandus, P., N. Morandeira & F. Schivo (eds.). Fundación Humedales / Wetlands International. Buenos Aires, Argentina.

Kantz, K. E. & Tucker, S.C. 1994. Developmental basis of floral characters in the Caesalpinieae. En: Ferguson I.K. & Tucker S.C. (eds.). Advances in Legume Systematics, part 6: Structural Botany, Kew: Royal Botanic Gardens pp. 33-40.

Katayama, N. & Suzuki, N. 2010. Anti-herbivory defense of two Vicia species with and without extrafloral nectaries. Plant Ecology 212: 743-752.

Kearns, C.A. & Inouye, D.W. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.

Keller, K.H. 1989. Ant-plant interactions. En: Abrahamson, W. G. (ed.). Plant-animal interactions. McGraw-Hill, N. Y. pp. 207-242.

Keller, K.H. 1977. The extrafloral nectaries of *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). American Journal of Botany 64: 1182-1188.

Keller, K.H. 1980. The extrafloral nectaries of *Ipomoea leptophylla* (Convolvulaceae). American Journal of Botany 67: 216-222.

Kelly, K.L. 1965. Color-name Charts Illustrated with Centroid Colors. Standard Sample No. 2106 Supl. to Nat. Bur. Standards Circ. 53. U.S. Government Printing Office, Washington, D. C.

Kenrick, J., Bernhardt, P., Marginson, R., Beresford, G., Knox, R.B., Baker, I. & Baker, H.G. 1987. Pollination-related characteristics in the mimosoid legume *Acacia terminalis*

(Leguminosae). Plant Systematics and Evolution 157: 49-62.

Kersch, M.F. & Fonseca, C.R. 2005. Abiotic factors and the conditional out come of an ant-plant mutualism. Ecology 86: 2117–2126.

Kirkbride, J.H.; Gunn, C.R. & Weitzman, A.L. 2003. Fruits and seeds of genera in the subfamily Faboideae (Fabaceae). Tech. Bull. 1890. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Washington DC.

Kodama, M.T. & Sartori, A.L.B. 2007. Caracterização morfológica de plântulas de *Hymenaea stigonocarpa* var. Stigonocarpa Mart. ex Hayne, H. stigonocarpa Hayne var. brevipetiolata N. Mattos e H. courbaril L. Revista Brasileira de Biociências 5: 663-665.

Koptur, S. 1979. Facultative mutualism between weedy vetches bearing extrafloral nectaries and weedy ants in California. Amer. J. Bot. 66: 1016-1020.

Koptur, S. 1984. Experimental evidence for defense of *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae) saplings by ants. Ecology 65: 1787-1793.

Koptur, S. 1985. Alternative defense against herbivores in *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae) over an elevational gradient. Ecology 66: 1639-1650.

Koptur, S. & Lawton, J. 1988. Interactions among vetches bearing extrafloral nectaries, their bioic protective agents, and herbivores. Ecology 69: 278-283

Koptur, S. 1991. Extrafloral nectaries of herbs and trees: modeling the interaction with ants and parasitoids. En Huxley, C.R. & Cutler, D.F. (eds.). Ant plant interactions. Oxford, New York, Tokyo. Oxford University Press pp. 213-259.

Koptur, S. 1992a. Plants with Extrafloral Nectaries and Ants in Everglades Habitats. The Florida Entomologist 75: 38-50.

Koptur, S. 1992b. Extrafloral nectary-mediated interactions, between insects and plants. En

Bernays, E. (ed.) Insect-plant interactions, vol. IV. CRC, Boca Raton, Flo pp. 81-129.

Koptur, S., Pascale, W. & Zuriany, O. 2010. Ants and plants with extrafloral nectaries in fire successional habitats on Andros (Bahamas). Florida Entomologist 93: 90-99.

Kumar, P., Prakash, R. & Haque, M.D.F. 1976. Floral biology of cowpea (*Vigna sinensis* L.). Tropical Grain Legume Bulletin 6:9-11.

Kuo, J. & Pate, J.S. 1985. The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp): I. Morphology, anatomy and fine structure. Planta 166:15-27.

Lahitte, H.B. & Hurrell, J.A. 2004. Plantas de la costa. L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina.

Leython, S. & Jâuregui, D. 2008. Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (Leguminosae-Mimosoideae) de Venezuela. Rev. Biol. Trop. 56: 1075-1086.

Lovey, R.J., Perissé, P., Vieyra, C. & Coraglio, J.C. 2010. Caracterización de semilla, germinación y plántula de *Cologania broussonetii* (Balb.) DC. Φyton 79: 5-10.

Machado, S.R., Morellato, L.P.C., Sajo, M.G. & Oliveira, P.S. 2008. Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the Brazilian Cerrado. Plant Biology 10: 660-673.

Maheshwari, J.K. 1954. The structure and development of extrafloral nectaries in *Duranta plumieri* Jacq. Phytology 4: 208-211.

Marèchal, R., Mascherpa, J.M. & Stainier, F. 1978. Ètude taxonomique d`un groupe complexe d`espèces des generes *Phaseolus* et. *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de donnes morfologiques et polliniques, traitées par L`analyse ingormatique. Bossiera 28: 1-273.

Maréchal, R., Masherpa, J.M. & Stainier, F. 1981. Taxonometric study of the *Phaseolus-Vigna* complex and related genera. En: R.M. Pollhill and

P.H. Raven (eds.). Adv. in Legume Systematic 1: 329-335.

Marino, G.D., Mas, M.V. & Orlandoni, M.J. 2008. Morfología y reconocimiento de las principales especies leñosas nativas de la provincia de Santa Fe, Argentina, en el estado de plántula. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 43: 67-81.

Marques, M.O., Almeida dos Santos, P., Fernandes Vinhas, A., Souza, A.L.V., Lopes de Carvalho, C.A. & Lydio Meira, J. 2005. Vespas sociais (Hymenoptera: Vespidae) visitantes de nectários de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. na regiao do recôncavo da Bahia. Magistra 17: 64-68.

McKey, D. 1987. Interactions between ants and leguminous plants. En Stirton, C. H. & Zarucchi, J.L. (eds.). Advances in Legume Biology. Missouri Botanical Garden, St. Louis, USA pp. 673-718.

McKey, D. 1989. Interactions between ants and leguminous plants. En: Stirton C.H. & Zarucchi J.L. (eds.) Advances in Legume Biology. St. Louis, USA. Missouri Botanical Garden St. Louis pp. 673-718.

Melo, Y., Machado, S.R. & Marccus, A. 2010. Anatomy of extrafloral nectaries in Fabaceae from dry-seasonal forest in Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 163:87-98.

Mizell, R. F. 2004. Many plants have extrafloral nectaries helpful to beneficials. USDA ARS http://edis.ifas.ufl.edu/IN175.

Nepi, M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. En: Nicolson SW, Nepi M & Pacini E. (eds.). Nectaries and nectar. Dordrecht: Springer pp. 129-166.

Offler, C.E., McCurdy, D.W., Patrick, J.W. & Talbot, M.J. 2002. Transfer cells: Cells Specialized for a Special Purpose. Annual Review of Plant Biology. 54:431–54.

Ojehomon, O. 1968. The development of the inflorescence and extra-floral nectarines of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Jour. West African Sciences Association 13: 93 -110.

Ojehomon, O.O. & Sanyaolu, M.O. 1970. Ovule formation, and embryo development in persisting and

abortive fruits of the cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Nigerian Journal of Science 4: 31-40.

Osborn, M.M., Kevan, P.G. & Lane, M.A. 1988. Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in Southern Colorado. Plant Systematic and Evolution 159:85-94.

Palacios, R.A. & Bravo, L. 1974. Estudio morfológico de las semillas de algunos *Prosopis* del Nordeste argentino. Darwiniana 18: 437-452.

Palacios, R.A. & Hoc, P.S. 2001. Phaseoleae. Flora fanerogámica Argentina. Fasc. 75, 128. Fabaceae, parte 12. CONICET, Buenos Aires.

Pate, J.S., Peoples, M.B., Storer, P.J. & Atkins, C.A. 1985. The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) II. Nectar composition, origin of nectar solutes, and nectary functioning. Planta 166: 28-38.

Paulino, V.J., Pessine, E. & de Pádua Teixeira, S. 2010. Estudos morfoanatômicos da semente e da plântula de espécies de *Anileiras*

(Indigofera L., Leguminosae). Acta Botanica Brasilica 24:1-7.

Perícola, N., Dottori, N., Cosa, M.T., Bruno, G. & Hadid, M. 2004. Estudio morfoanatómico de la plántula de *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 39: 67-73.

Prenner, G. 2004. New aspects in floral development of Papilionoideae: initiated but suppressed bracteoles and variable initiation of sepals. Annals of Botany 93: 537-545.

Ramirez-Domenech, J. & Tucker, S. C. 1988. Patterns of Organ Development in Mimosoid Legume Flowers. En Leins P., Tucker S.C. & Endress P.K. (eds.). Aspects of Floral Development. J. Craner, Berlin pp. 171-180.

Rickson, F.R. & Rickson, M.M. 1998. The cashew nut, *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), and its perennial association with ants: extrafloral nectary location and the potential

for ant defense. American Journal of Botany 85: 835-849.

Richards, A.J. 1986. Plant breeding systems. George Allen & Unwin. London.

Rodrigues, R.S. & Tozzi, A.M.G.A. 2007a. Morphological analysis and re-examination of the taxonomic circumscription of *Acosmium* (Leguminosae, Papilionoideae, Sophoreae). Taxon 56: 439-452.

Rodrigues, R.S. & Tozzi, A.M.G.A. 2007b. Morfologia de plântulas no clado *Vatairea* (Leguminosae, Papilionoideae). Rodriguésia 58: 207-220.

Rodrigues, R.S. & Tozzi, A.M.G.A. 2008. Systematic relevance of seedling morphology in *Acosmium*, *Guianodendron*, and *Leptolobium* (Leguminosae, Papilionoideae) Brittonia 60: 287–296.

Rudgers, J.A. & Strauss, S.Y. 2004. A selection mosaic in the facultative mutualism between ants and wild cotton. The royal society 271: 2481-2488.

Ruhren, S. 2003. Seed predators are undeterred by nectar-feeding ants on Chamaecrista nictitans (Caesalpineaceae). Plant Ecology 166: 189–198.

Sánchez Sánchez, O. & Hernández Zepeda, C. 2004. Estudio morfológico de plántulas de la familia Bombacaceae en Quintana Roo, México. Foresta Veracruzana 6:1-6.

Scarpa, G. 2007. Plantas asociadas a la pesca y a sus recursos por los Indígenas Chorote del Chaco Semiarido (Argentina). Bol. Soc. Argent. Bot. 41: 333-345.

Schinini, A., Ciotti, E.M., Tomei, C.E., Castelán, M.E. & Hack, C.M. 2004. Especies nativas de campos bajos con potencial valor forrajero. Agrotecnia 12: 18-22.

Smith, D.L. 1981. Cotyledons of the Leguminosae. En Advances in Legume Systematics: Part 2. Edited by R.M. Polhill & P.H. Raven. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Richmond, U.K.

Sousa Paiva, E.A. & Rodriguez Machado, S. 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estructura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne (Fabaceae–Caesalpinioideae). Acta Botanica Brasilica 20: 471-482.

Sousa Paiva, E.A. & Rodriguez Machado, S. 2010. Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in Hymenaea stigonocarpa (Fabaceae-Caesalpinioideae) leaves. Nordic Journal of Botany 24: 423-431.

Stearn, W.T. 1973. Botanical Latin. David & Charles, Newton Abbot.

Subramanian, D. 1979. Morphological Studies in Vigna and Its Related Genera. Journal of the Indian Botanical Society 58: 247-56.

Tell Bertoni, G. 1908. Leguminosas. Trabajos de la Estación Agronómica de Puerto Bertoni. Resumen de Algunos Ensayos Agrícolas.

Tucker, S.C. 1984. Origin of symmetry in flowers. En: White R.A. & Dickinson W.C. (eds.).

Contemporary problems in plant anatomy. New York pp. 351-396.

Tucker, S.C. 1987 Floral initiation and development in legumes. En: Stirton, C.H. (ed.) Advances in legume systematics. Part 3. Royal Botanic Gardens, Kew pp. 183-239.

Tucker, S.C. 1989. Overlapping organ initiation and common primordia in flowers of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoideae). American Jounal of Botany 76: 714–729.

Tucker, S.C & Stirton, C.H. 1991. Development of the cymose inflorescence, cupulum and flower of *Psoralea pinnata* (Leguminosae: Papilionoideae: Psoraleeae). Botanical Journal of the Linnean Society 106: 209-227.

Tucker, S.C. 2003. Floral development in legumes. Plant Physiology 131:911-926.

Ubiergo, P. & Lapp, M. 2007. Caracterización morfológica de semillas de algunas especies de los géneros Cassia L. y Senna Mill. (Leguminosae Juss.).

Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 24: 426-441.

Ugborogho, R.E. & Agomo, C.O. 1989. Morphology, classification and reproductive biology of *Vigna unguiculata* L. Walpers Papilionaceae in Nigeria. Feddes Repertorium 100: 137-145

Vaillancourt, R.E., Weeden, N.F., Bruneau, A. & Doyle, J.J. 1993. Chloroplast DNA phylogeny of Old World *Vigna* (Leguminosae). Systematic Botany 18: 642–655.

Vaz, C.G., Oliveira, D. & Ohashi, O.S. 1998. Pollinator contribution to the production of cowpea in the Amazon.Hortscience 33: 1157-1159.

Veasey, E.A., Negrâo, M.O., Martins, P.S & Bandel, G. 1999. Early growth and seedling morphology of species of *Sesbanis* Scop. (Leguminosae, Robinieae). Scientia Agricola 56: 329-335.

Vesprini, J.L., Galetto, L. & Bernardello, G. 2003. The beneficial effect of ants on the reproductive success of Dyckia floribunda

(Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. Canadian Journal of Botany 81: 24-27.

Werker, E. 1997. Seed anatomy. 1st ed. Berlin: Borntraeger.

Woolwine, A.E. & Reagan, T.E. 2001. Potential of winter cover crops to increase abundance of Solenopsis invicta (Hymenoptera: Formicidae) and other arthropods in sugarcane. Environmental Entomology 30: 1017-1020.

Ye, N.G. 1983. Studies on the seedling types of dicotyledonous plants (Magnoliophyta, Magnoliopsida). Phytologia 54: 161-189.

Zamora-Cornelio, L.F., Ochoa-Gaona, S., Vargas Simón, G., Castellanos Albores, J. & de Jong, B.H.J. 2010. Germinación de semillas y clave para la identificación de plántulas de seis especies arbóreas nativas de humedales del sureste de México. Revista de Biología Tropical 58: 717-732.

Zheng, Y. & Wang, Z. 2010. Structural character of sorghum endosperm transfer cells and

their relationship with embryo and endosperm. International Journal of Plant Biology 1: 74-77.

Zimmerman, J.G. 1932. Über die extrafloralen nectarien der Angiospermen. Beihefte zum botanischen Zentralblatt 49: 99-196.