

## ANORMALIDADES MORFOANATOMICAS EN OVULOS Y SEMILLAS DE *Canavalia ensiformis* (L.) DC.

Damelis Jáuregui T. y  
Julio Viera D.

### RESUMEN

En este trabajo se describen algunas irregularidades morfoanatómicas observadas en óvulos y semillas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. y se discute su importancia como factor inductor de abortión. Para ello se colectaron botones próximos a abrir de las porciones basal, medio y apical de racimos ubicados en tres estratos del eje principal de las plantas; a éstos se les extrajo el ovario y se fijó en FAA para su posterior procesamiento, por el método de inclusión en parafina. También se colectaron semillas provenientes de frutos maduros, las cuales se clasificaron de acuerdo a sus irregularidades morfológicas, separándolas en cubierta seminal y embrión, se seccionó la primera a mano alzada, preparando láminas semi-permanentes y se observó el segundo bajo microscopio estereoscópico. En su mayoría, los óvulos tuvieron apariencia normal; sin embargo, en algunos se evidenció el colapsamiento y/o degeneración de células de la nucela y del saco embrional. En las semillas se observaron anomalías estructurales en la cubierta seminal y el embrión. No pudo establecerse una relación directa entre anomalías estructurales y abortión.

**Palabras clave:** *Canavalia ensiformis* (L.) DC., óvulo, semilla, estructura, abortión, anomalías.

### ABSTRACT

In this paper, some morpho-anatomy irregularities observed in ovules and seeds of *C. ensiformis* are described and their impor-

\* Profesores del Instituto de Botánica Agrícola y Genética Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Apartado 4579. Aragua

tance as abortion inducer factor is discussed. For this purpose, flower button near open were collected from basal, medium and apical sections of racemes from three plant strata, basal, medium and apical. The ovary of these buttons were extracted and fixed in FAA for later processing by the method of paraffine inclusion. Seeds from ripe legumes were also collected and classified according to their morphological irregularities, and separated in two parts, covers and embryos. Covers were sectioned by hand for semipermanent laminas and embryo were observed through stereoscopy microscopy. Most of the ovules had normal appearance; however, some of them showed collapse evidences, and nucellus and ambryo sac degenerations. In the seeds, structural abnormalities were observed in the cover and the embryo. It was not possible to establish a direct relationship between structural abnormalities and abortion.

**Key words:** *C. ensiformis* (L.) DC., ovule, seed, structure, abortion, abnormalities.

## INTRODUCCION

En muchas plantas los óvulos abortan en diferentes fases del desarrollo, constituyendo ésto un aspecto muy importante en la reproducción sexual. Esta aborción puede estar correlacionada con factores ambientales especialmente condiciones extremas o desarrollo anormal del óvulo.

La estructura de óvulos y semillas que no abortan ha sido investigada en varias leguminosas, entre ellas *Canavalia*; sin embargo, son escasos los estudios anatómicos comparativos entre estructuras abortadas y no abortadas.

Un carácter intrínseco de las plantas es su capacidad para desarrollar estructuras normales que puedan crecer y transformarse en órganos completamente efectivos. En relación con ello, se debe destacar que en ocasiones pueden ocurrir anomalías genéticas o fallas en el desarrollo de los óvulos que impiden que se transformen en semillas.

Sastrapradja y col. (1975) relacionaron el alto porcentaje de aborción encontrado en *Canavalia ensiformis* con esterilidad de óvulos.

En *Phaseolus vulgaris* se encontró que óvulos provenientes de botones con alto potencial de abscisión mostraron un alto porcentaje (96%) de anomalías anatómicas e irregularidades en el desarrollo del saco embrionario; en contraste, pocos óvulos de flores con bajo potencial de abscisión (31%) fueron anormales (Yañez y col., 1984).

Vischnyakova (1991) indicó que en ocasiones la causa de la senescencia de óvulos puede no ser clara y que pueden ocurrir cambios fisiológicos y/o factores genéticos que determinan tal degeneración. También pueden ser el resultado de una condición de estrés en la cual esté creciendo la planta.

En *Phaseolus vulgaris* se han observado necrosis del saco embrionario y de la nucela, ausencia o desarrollo retardado del saco embrionario (Yañez y col., 1984). También en caraota, Sage y Webster (1990) indicaron que en semillas abortadas ocurrió una disminución del almidón, incremento en la vacuolización y distorsión de las paredes del tegumento, lo cual interrumpió el balance nutricional.

En diferentes especies de Leguminosae, Brassicaceae y Solanaceae se encontró que los óvulos estériles de flores abiertas presentaron depósitos de calosa (fluorescente) en la región calazal del óvulo, difundiéndose por la superficie del saco embrionario y probablemente taponando las células del tegumento, epidermis nucelar y tejido nucelar hipodérmico, variando la cantidad de calosa de una especie a otra (Vischnyakova, 1991).

En este trabajo se describen algunas irregularidades observadas en óvulos y semillas de canavalia, y se discute su importancia como factor inductor de abortación.

## MATERIALES Y METODOS

Se seleccionó al azar una planta por parcela, en de 9 parcelas sembradas con semillas de Canavalia, genotipos Frutos Cortos 1 y Yaracuy.

A. **Óvulos:** En cada planta se tomó al azar un racimo de los estratos basal (nudos 1 y 2), medio (nudos 3-6) y apical (del nudo 7 en adelante) y en él se colectó un botón de su zona basal, media y apical. Los botones estaban próximos a abrir,

se disectaron bajo microscopio estereoscópico y los ovarios se fijaron en FAA 50% (formaldehído-ácido acético-etanol 50%), para su posterior procesamiento.

Este material se deshidrató en una serie creciente de alcohol butílico terciario y fue embebido e incluido en parafina (56-58° punto de fusión), se seccionó en un micrótomo de rotación marca Leitz, a un espesor de 15 m. Las secciones obtenidas fueron teñidas sin desparafinar con azul de toluidina acuosa (0,05%) o desparafinadas, con safranina-fastgreen (Johansen, 1940 y Sakay, 1973). Se desparafinaron con xilol y se montaron en eukitt.

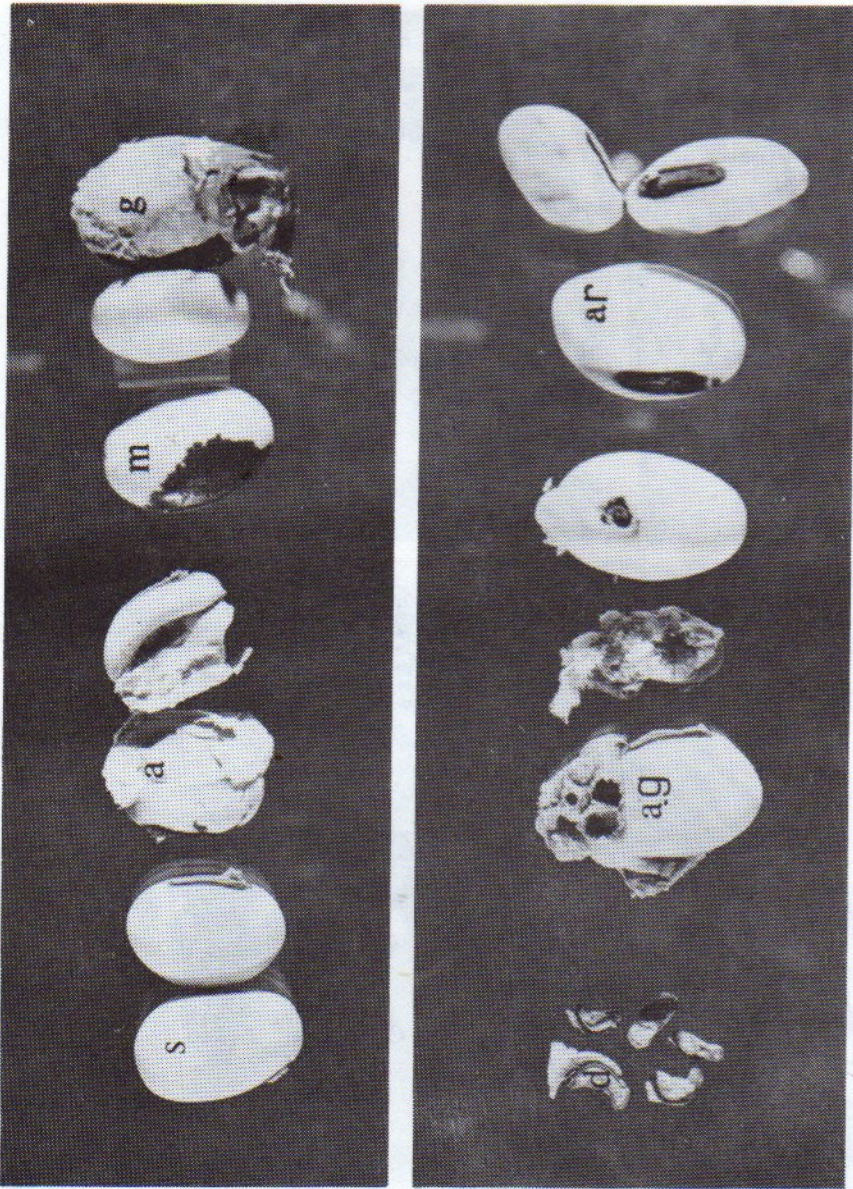
Las observaciones se realizaron con un microscopio binocular marca Leitz. Se tomaron fotografías con una cámara incorporada a un microscopio óptico.

B. **Semillas:** El fruto maduro de canavalia presentó una variedad de semillas, éstas se clasificaron en: sanas (s), anómalas (a), las cuales incluyen arrugadas y con cubierta seminal con desarrollo incompleto, manchadas (m), sin desarrollo (d), con entomocecidios (ag), germinadas (g) y podridas (p) (Figura 1).

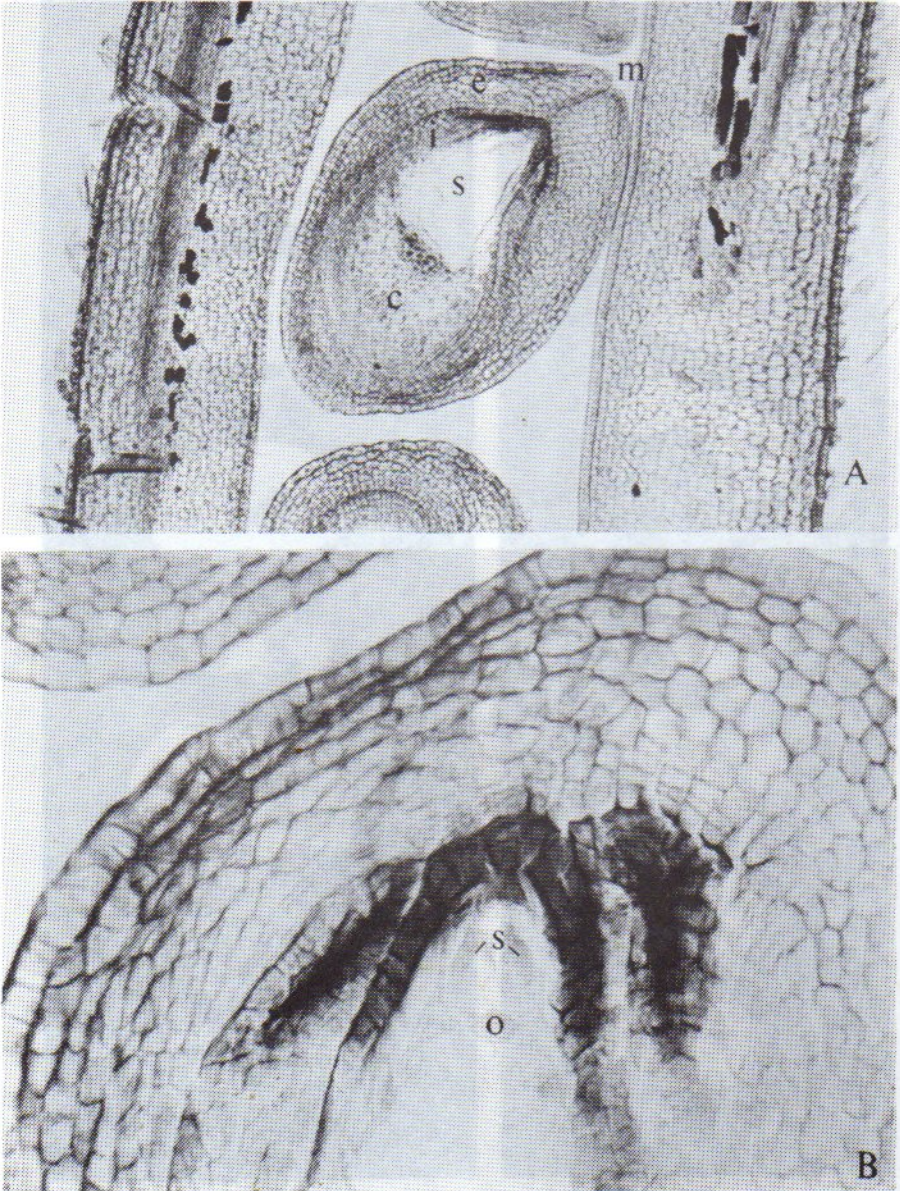
Las semillas "adultas" con irregularidades morfológicas se separaron bajo microscopio estereoscópico, en embrión y cubierta seminal, esta última se seccionó a mano alzada, en el flanco lateral, tiñendo los cortes con azul de toluidina acuosa (0,05%) y preparando láminas semipermanentes para su observación bajo microscopio óptico. El embrión fue estudiado bajo microscopio estereoscópico.

## RESULTADOS Y DISCUSION

A. **Ovulos:** En cada ovario hubo un número variable de óvulos, los cuales son campilotropos y están unidos al ovario por un amplio funículo. La estructura anatómica de la mayoría de los óvulos observados fue aparentemente normal, conformados por dos tegumentos (uno externo de 4-6 capas y uno interno de 2-3 estratos de células), la nucela y el saco embrional (Figura 2). En este último se observó con frecuencia el aparato ovular y núcleo polar, no así las antípodas, ello puede obedecer a que las mismas sean efímeras,



**Figura 1.** Semillas de *Canavalia ensiformis* procedentes de frutos maduros. Sana (s), con cubierta seminal de desarrollo incompleto y arrugada (a), manchada (m), germinada (g), con desarrollo incipiente (d), con entomocecidios (ag).

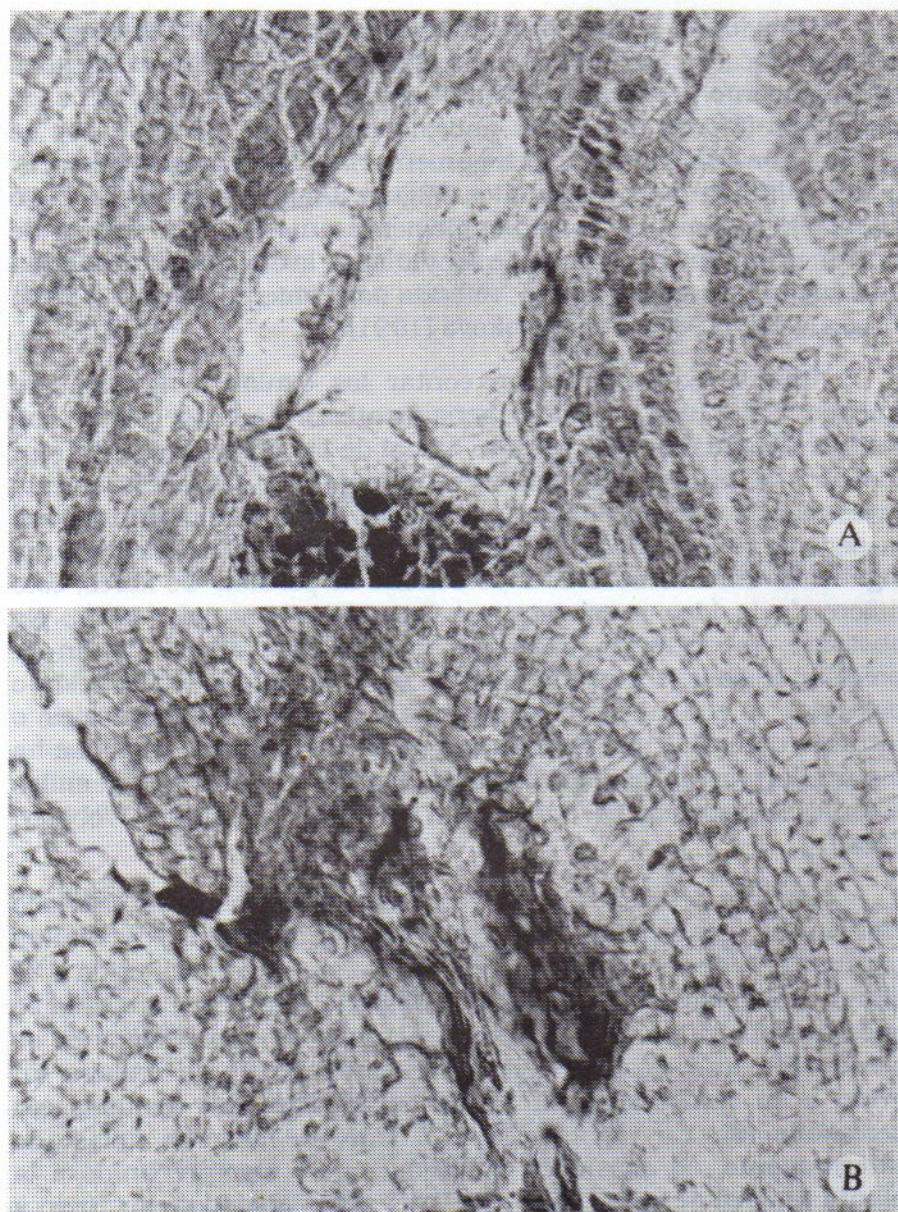


**Figura 2.** Estructura anatómica del óvulo de *Canavalia ensiformis*. A. Tegumentos (e, i), micrópilo (m), calaza (c) y saco embrional (s) 100 X. B. Detalle del aparato ovular, nótese dos sinérgidas (s) y la ovocélula (o)

En algunos óvulos, principalmente aquellos provenientes de ovarios ubicados en el estrato apical de las plantas, fue evidente el colapsamiento y/o degeneración de células de la nucela y del saco embrional (Figura 3). Estas anomalías en ciertos casos se extendieron hasta las células tegumentarias. Es necesario destacar que la calaza de óvulos anómalos (Figura 3A) presentó células cuyo citoplasma reaccionó considerablemente ante las dos formas de tinción utilizadas, lo cual puede ser índice de la deposición de alguna sustancia, tal como la calosa, referida por Pimienta y Polito (1982), Briggs y col. (1987) y Vishyankova (1991).

Aunque no se pudieron contar los óvulos anormales, su frecuencia fue baja y, como se señaló anteriormente, se localizaron fundamentalmente en el estrato apical de las plantas, esto parece indicar que, bajo las condiciones de manejo de la *Canavalia* en esta investigación y el momento de muestreo (previo a la autofertilización), la degeneración del aparato ovular y núcleo polar no repercutió significativamente en el alto porcentaje de pérdida de flores; esto difiere de la idea propuesta por Sastrapradja y col. (1975). No obstante, es necesario investigar más en este sentido, a fin de precisar si existe un momento específico durante la fertilización o posterior a ella en que se sucedan cambios estructurales o ultraestructurales que puedan ser causa de abortación, como se ha reportado para otras especies que producen óvulos y/o semillas estériles (Mogensen, 1975; Pimienta y Polito, 1982; Sage y Webster, 1990).

Hay que destacar que en ocasiones la degeneración del saco embrional (postfertilización) no causa abscisión, los óvulos permanecen dentro del fruto maduro y éste queda adherido a la planta, como ocurre en aguacate (Sedgley, 1980). En *Canavalia* se encontraron frutos en los que en algunas de sus posiciones se presentaba una cicatriz, donde presumiblemente se hallaba un óvulo o en otros casos encontramos las llamadas semillas sin desarrollo (d). En ambos casos el fruto se observa aplastado externamente, en ocasiones enroscado, pero siempre unido a la planta (Figura 4); resultados similares son señalados por Brun y Betts (1984) en soya.



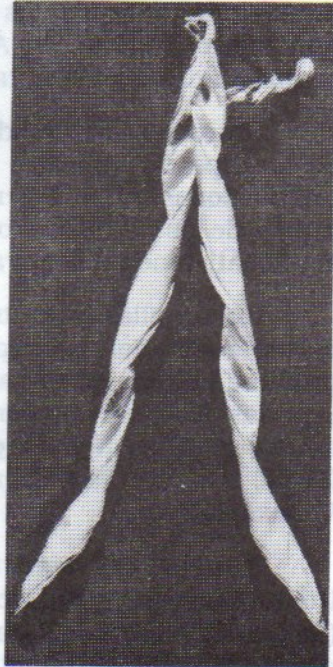
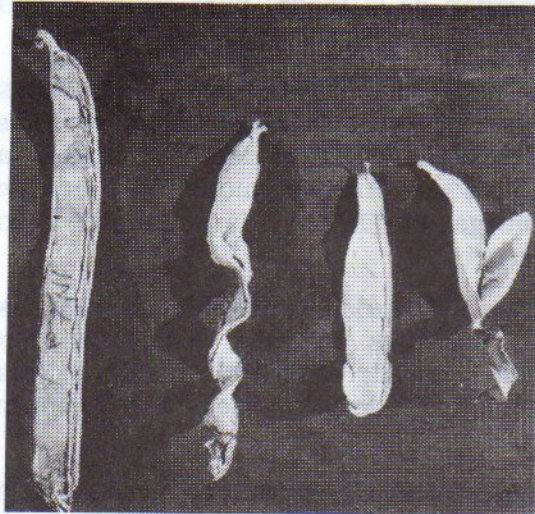
**Figura 3.** Anormalidades anatómicas en el óvulo de *Canavalia ensiformis*.  
A. Zona nuclear y del saco embrional hueca 400 X. B. Tejido nuclear  
con células colapsadas 400 X.



Alcornoque especie) entre el grupo de semillas -d- por cuanto posiblemente algunos genéticamente compactos abortan en etapas tempranas de su desarrollo; la literatura señala que esta aborción puede ser una forma de ajustar el número de semillas dentro del fruto de acuerdo a la capacidad de los nutrientes (Béliz y cols. 1977).

### B. Semillas

semillas reveló anomalías morfológicas intermedias



**Figura 4. A yB.** Frutos de *Canavalia ensiformis* maduros con diferentes grados de aplastamiento y enroscamiento. **C.** Valva de fruto, mostrando cicatrices dejadas por óvulos (indicadas con flechas).

Atención especial merece el grupo de semillas -d- por cuanto posiblemente cigotos genéticamente competentes abortan en estados tempranos de su desarrollo; la literatura señala que esta aborción puede ser una forma de ajustar el número de semillas dentro del fruto de acuerdo a la capacidad de la madre para suplirlas con nutrimentos (Briggs y col., 1987).

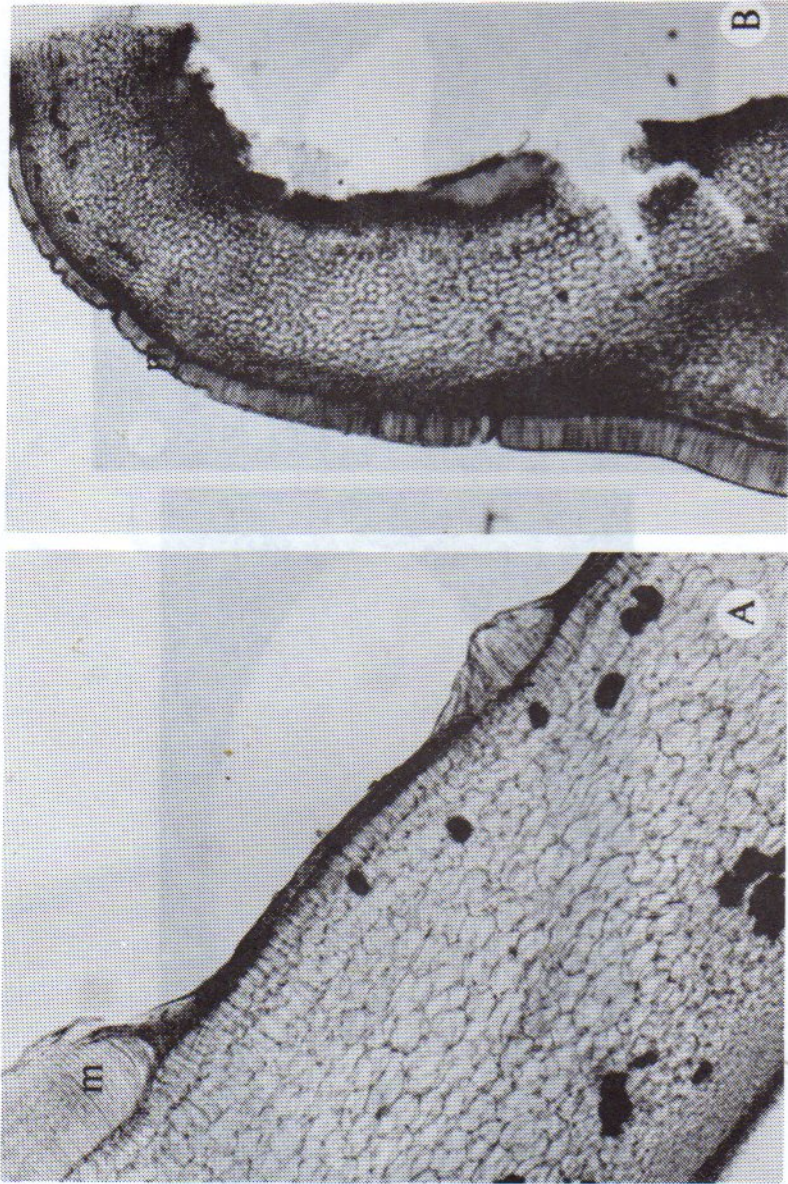
**B. Semillas:** El estudio anatómico de las cubiertas seminales reveló anomalías estructurales en aquellas semillas morfológicamente irregulares; estas se detectaron al comparar la disposición de los tejidos en las secciones obtenidas con el arreglo histológico descrito por Ambegaokar (1976) y Jáuregui (1991) en semillas normales de esta especie.

Entre las anormalidades observadas se pueden citar: células de la capa de Malpighi de diferentes tamaños, lo cual provoca ondulaciones en la superficie seminal; paredes celulares de esta capa y de las células en forma de reloj de arena que no se engruesan significativamente (Figura 5) .

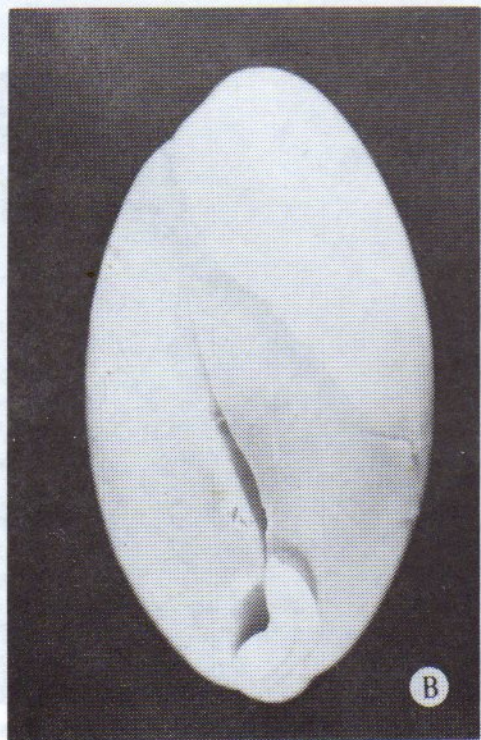
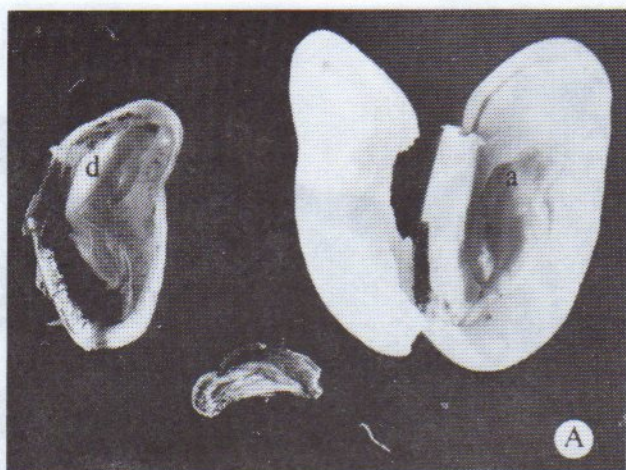
Las semillas con entomocecidios presentaron hipertrofias en la cubierta seminal, principalmente a nivel del parénquima, el cual prolifera. Estos tumores han sido reportados anteriormente en semillas de *Canavalia* por Da Costa (1962) señalando como agente causal a *Trichencyrtus gahani* Gómez, asimismo Montagne y col. (1995) aseguran la presencia de este Hymenoptera (Encyrtidae) en Venezuela.

A nivel del embrión también fueron evidentes ciertas irregularidades morfológicas, así: presencia de cotiledones asimétricos (Figura 6B), en otros casos los hundimientos y/o estrías de la cubierta seminal (en semillas anómalas) se visualizan sobre ellos. En semillas sin desarrollo (d) pueden ocurrir o no embriones, si presentes están colapsados y deformes, producto probablemente de una deficiente traslocación de metabolitos (Figura 6A).

El estudio a nivel de óvulos y semillas de *Canavalia* reveló la posibilidad de que el proceso inductor de aborción pueda iniciarse tanto a nivel de tejido embriogénico como no embriogénico (nucelategumentos), en el primer caso posiblemente por disrupción del balance nutricional. Sage y Webster (1990) trabajando con *Phaseolus vulgaris* señalaron que los procesos de aborción iniciales estaban



**Figura 5.** Sección transversal de la testa de semillas de *Canavalia ensiformis* con irregularidades. A. de semillas anómalas -a- (100X), B. de semillas sin desarrollo -d- (40X), nótese células de la capa de Malpighi (m) y células en forma de reloj de arena (h).



**Figura 6.** Embriones de *Canavalia ensiformis* (L.) DC provenientes de semillas A. sin desarrollo -d-, anómalas -a-; B. con entomocecidio, nótese cotiledones asimétricos.

relacionados con cambios en el tejido maternal de la semilla y no en tejido embriogénico. También, Yañez y col. (1984) encontraron también alteraciones a nivel del megagametófito de esta especie.

Es importante acotar que en *Canavalia* la aborción de unidades morfológicas semilla/fruto ocurrió en más de un estado de desarrollo, lo que sugiere que hay más de un estado crítico en el cual un factor inductor de aborción puede estar actuando. La frecuencia de óvulos anómalos (aunque no cuantificada) en el estrato apical de plantas de *Canavalia* puede relacionarse posiblemente con una reducción de asimilados hacia esta región o puede ser el resultado de una interacción hormonal entre órganos reproductivos. En correspondencia con ello, Tamas y col. (1979), trabajando con *P. vulgaris*, indicaron que la competencia entre frutos puede afectar todos los estados de desarrollo reproductivo y que su efecto puede ser significativo sobre la formación de flores, abscisión de las mismas y caída temprana de frutos. El mecanismo de control no es conocido, pero indican que puede tener relación con el contenido de ácido abscísico.

### BIBLIOGRAFIA

- AMBEGAOKAR, K.B. 1976. Seed anatomy of some legumes. Indian J. Agric. Sci. 46 (1): 8-15.
- BRIGGS, C.L.; M. WESTOBY; P.M. SELRIRK and R.J. OLDFIELD. 1987. Embriology of early abortion due to limited maternal resources in *Pisum sativum* L. Annals of Botany 59:611- 619.
- BRUN, W.A. y K.J. BETTS. 1984. Source/sink relations of abscising and non abscising soybean flowers. Plant Physiol. 75:187-191. Citado por: Ney y col. 1993.
- Da COSTA, L. A. 1962. Insetos do Brasil. Hymenoptera. 2 da Parte. Escola Nacional de Agronomia. Serie Didactica N° 14. 251p.
- JAUREGUI, D. 1991. Ontogenia comparada del fruto de dos genotipos de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. Trabajo de Ascenso Universitario. Fac. Agronomia. Universidad Central de Venezuela. 139 p.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. Mc. Graw Hill. Book Company Inc. New York. 1ra ed.

- MOGENSEN, H. L. 1975. Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). Amer. J. Bot. 62(2):160-165.
- MONTAGNE, A.; J. VIERA; J.L. GARCIA y M. CERMELI. 1995. Presencia de *Trichencyrtus gahani* (Hymenoptera: Encyrtidae) en *Canavalia ensiformis*. XIV Congreso Venezolano de Entomología. Julio 5 al 9. Barquisimeto, Edo. Lara.
- NEY, B.; C. DUTHION and E. FONTAINE. 1993. Timing of reproductive abortions in relation to cell division, water content and growth of pea seeds. Crop. Sci. 33:267-270.
- PIMIANTA, E. and V.S. POLITO. 1982. Ovule abortion in non pareil almond *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb. Amer. J. Bot. 69:913-920.
- PRAKASH, N. 1987. Embriology of the leguminosae. In Advances in legume systematics. Part 3. ed. CH. Stirton. Royal Botanical Gardens, Kew. 241-262.
- SAGE, T. L. and B. D. WEBSTER. 1990. Seed abortion in *Phaseolus vulgaris* L. Bot. Gaz. 151(2):167-175.
- SAKAI, W.W. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. Stain Technol. 48:247-249.
- SASTRAPRADJA, S.; S. H. AMINAH; I. LUBIS and D. SASTRAPRADJA. 1975. Studies in the javanese species of *Canavalia* I. Floral biology and cytology. Annales Bogorienses 6(1): 43-56.
- SEDGLEY, M. 1980. Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. Ann. Bot. 46: 771-777.
- TAMAS, I. A.; D. H. WALLACE; P. L. LUDFORD and J.L. OZBUN. 1979. Effect of older fruits on abortion and abscissic acid concentration of younger fruits in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 64:620-622.
- VISCHNYAKOVA, M.A. 1991. Callose as an indicator of sterile ovules. Phytomorphology 41(3-4): 245-252.
- YAÑEZ, P.; E. PIMIANTA; E. MARK and J. KOHASHI. 1984. Comparative anatomy of flower buds with and without potentia for abscission in *Phaseolus vulgaris*. Turrialba 34(4):431-435.