



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN MODALIDAD  
TESINA

“Análisis comparativo de la estructura floral y la embriología en *Linum burkartii* y *L. usitatissimum* (Linaceae-Linoideae)”



Lugar de trabajo: Laboratorio de Anatomía del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-UNNE-CONICET)



Alumna: Paula Andrea Gustín



Directora: Dra. (Lic.) Elsa Clorinda Lattar

2018

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, quien guía mis pasos y bendice mis días. A mi familia que es mi sostén, mi refugio y me dan las fuerzas para continuar. A Jonathan, mi compañero de vida quién me apoya en todo lo que emprendo. A mis amigos que siempre están para tenderme una mano y compartir buenos momentos. A la Dra. Elsa Lattar, mi directora de tesina y mi codirectora de beca, excelente persona y profesional que supo entregarme sus conocimientos por completo, sin restricciones, y por su apoyo incondicional. También quiero agradecer a la Dra. María Silvia Ferrucci, mi directora de beca, por su formación y sus valiosas correcciones que me ayudaron a crecer y aprender mucho en estos años. A la Dra. Betiana Angulo, mi subdirectora de beca, quien me acompañó en la rama de la genética y me permitió realizar a su vez una pasantía. A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste, por las becas otorgadas. Al personal del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-UNNE-CONICET) por permitirme realizar los viajes de colección y por su buena disposición ante mis inquietudes. A la Dra. Ana María Gonzalez por recibirme en el laboratorio de Anatomía Vegetal (IBONE-UNNE-CONICET). Y para finalizar, a mis compañeras de laboratorio: Stella, Marina, Florencia, Valeria y Melisa, por su compañía diaria.

## ÍNDICE

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>                  | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>             | <b>2</b>  |
| <b>ANTECEDENTES .....</b>             | <b>4</b>  |
| Objetivos .....                       | 5         |
| Objetivos generales.....              | 5         |
| Objetivos particulares.....           | 5         |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>      | <b>5</b>  |
| Revisión bibliográfica .....          | 5         |
| Colección del material .....          | 6         |
| Anatomía .....                        | 7         |
| Viabilidad de polen .....             | 8         |
| <b>RESULTADOS.....</b>                | <b>8</b>  |
| Morfología floral.....                | 8         |
| Anatomía .....                        | 13        |
| Viabilidad de polen .....             | 16        |
| <b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b> | <b>20</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>             | <b>23</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

|  |          |
|--|----------|
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>2</b> |
| <b>Fig.1.</b> Resumen del árbol filogenético de la familia Linaceae .....                            | 3        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>5</b> |
| <b>Fig.2.</b> Mapa de la provincia de Entre Ríos indicando sitios de muestreos .....                 | 6        |
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>8</b> |
| <b>Fig.3.</b> Fotografías de las especies estudiadas en su ambiente .....                            | 10       |
| <b>Fig.4.</b> <i>Linum burkartii</i> , fotomicrografías obtenidas con MEB .....                      | 11       |
| <b>Fig.5.</b> <i>L. usitatissimum</i> , fotomicrografías obtenidas con MEB.....                      | 12       |
| <b>Tabla 1.</b> Cuadro comparativo de los caracteres florales .....                                  | 13       |
| <b>Fig.6.</b> <i>L. burkartii</i> y <i>L. usitatissimum</i> fotomicrografías obtenidas con MO .....  | 15       |
| <b>Tabla 2.</b> Cuadro de viabilidad de polen en las especies estudiadas.....                        | 16       |
| <b>Fig.7.</b> Gráfico de viabilidad de polen .....   | 16       |
| <b>Fig.8.</b> Viabilidad de polen, fotomicrografías obtenidas con MO .....                           | 17       |
| <b>Fig.9.</b> <i>L. burkartii</i> y <i>L. usitatissimum</i> , fotomicrografías obtenidas con MO .... | 19       |

## RESUMEN

*Linum* L. es el género de mayor relevancia agronómica dentro de la familia Linaceae. En Argentina esta familia está representada por 8 especies. El objetivo del trabajo realizado fue estudiar la morfo-anatomía floral y la embriología en *Linum burkartii* Mildner y *L. usitatissimum* L. Se utilizó material conservado en FAA (formol-alcohol-ácido acético) y se llevaron a cabo técnicas estándares para las observaciones con microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido, a fin de obtener información acerca de los caracteres florales y reproductivos. Con relación a la morfología floral, ambas especies comparten el tipo de inflorescencia, la simetría floral, el número de piezas y el tipo de antera. Los caracteres que las diferencian están dados por: el color de las flores (amarillas vs. azules), la forma de los sépalos (ovados a romboidales vs. ovados), la presencia de papilas en los márgenes de los sépalos (notables vs. inconspicuas), y el tipo de estigma (contorno circular vs. oblongo). Los caracteres embriológicos analizados comunes a ambas son: el desarrollo de la pared de la antera del tipo básico, el proceso de microsporogénesis de tipo simultáneo y la formación de tétradas tetraédricas. La epidermis de la antera es uniestratificada, papilosa; el endotecio es uniestratificado con engrosamientos fibrilares en forma de "U"; el tapete es de tipo secretor, los granos de polen son liberados en estadio bicelular y el tipo de gametofito es de tipo Polygonum. Por otra parte, los caracteres anatómicos que las diferencian son los engrosamientos fibrilares en las paredes del endotecio que en *L. burkartii* comienzan a desarrollarse en el estadio de granos de polen jóvenes, mientras que en *L. usitatissimum* en el estadio de granos de polen maduros; las células tapetales en *L. burkartii* son uninucleadas mientras que en *L. usitatissimum* son binucleadas, las antípodas son pequeñas y efímeras en *L. burkartii*, en cambio en *L. usitatissimum* son conspicuas y persistentes. La información obtenida es original y contribuirá a la caracterización de estas especies de *Linum* L.

## INTRODUCCIÓN

Linaceae es una familia con distribución cosmopolita. Cuenta con 14 géneros y 250 especies distribuidas en regiones tropicales y templadas (McDill *et al.* 2009). Estudios recientes basados en datos moleculares dividen a Linaceae en dos subfamilias: Hugonoideae y Linoideae (McDill *et al.* 2009). El género de mayor relevancia tanto en la economía mundial como en el desarrollo social es *Linum* L., el cual presenta 180 especies y es considerado uno de los géneros con mayor diversidad en cuanto al número de especies dentro de la familia (McDill *et al.* 2009). Para Argentina se citan 2 géneros y 9 especies (Zuloaga *et al.* 2008), el principal representante es *Linum usitatissimum* L., “lino”, especie ampliamente cultivada como textil por sus fibras floemáticas caulinare y como oleaginosa por el aceite que proporcionan sus semillas denominado aceite de linaza, del cual Argentina fue en 2002 uno de los principales países exportadores, concentrándose su área de siembra en las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires (Barreyro *et al.* 2002). Su semilla tiene una larga historia de consumo en Europa y Asia, y sus colores varían desde el marrón oscuro al amarillo (Lenzi de Almeida *et al.* 2008). Esta semilla también es rica en proteínas, como ha sido demostrado en algunos estudios que señalan que la composición aminoacídica encontrada en la proteína de la linaza es similar a la de la soja, considerada como una de la más nutritivas entre las proteínas de origen vegetal (Lenzi de Almeida *et al.* 2008). Un carácter interesante en la familia es la presencia de heterostilia en algunas especies de *Linum* L., reconocida por Darwin (1864) en flores de *Linum perenne* L.

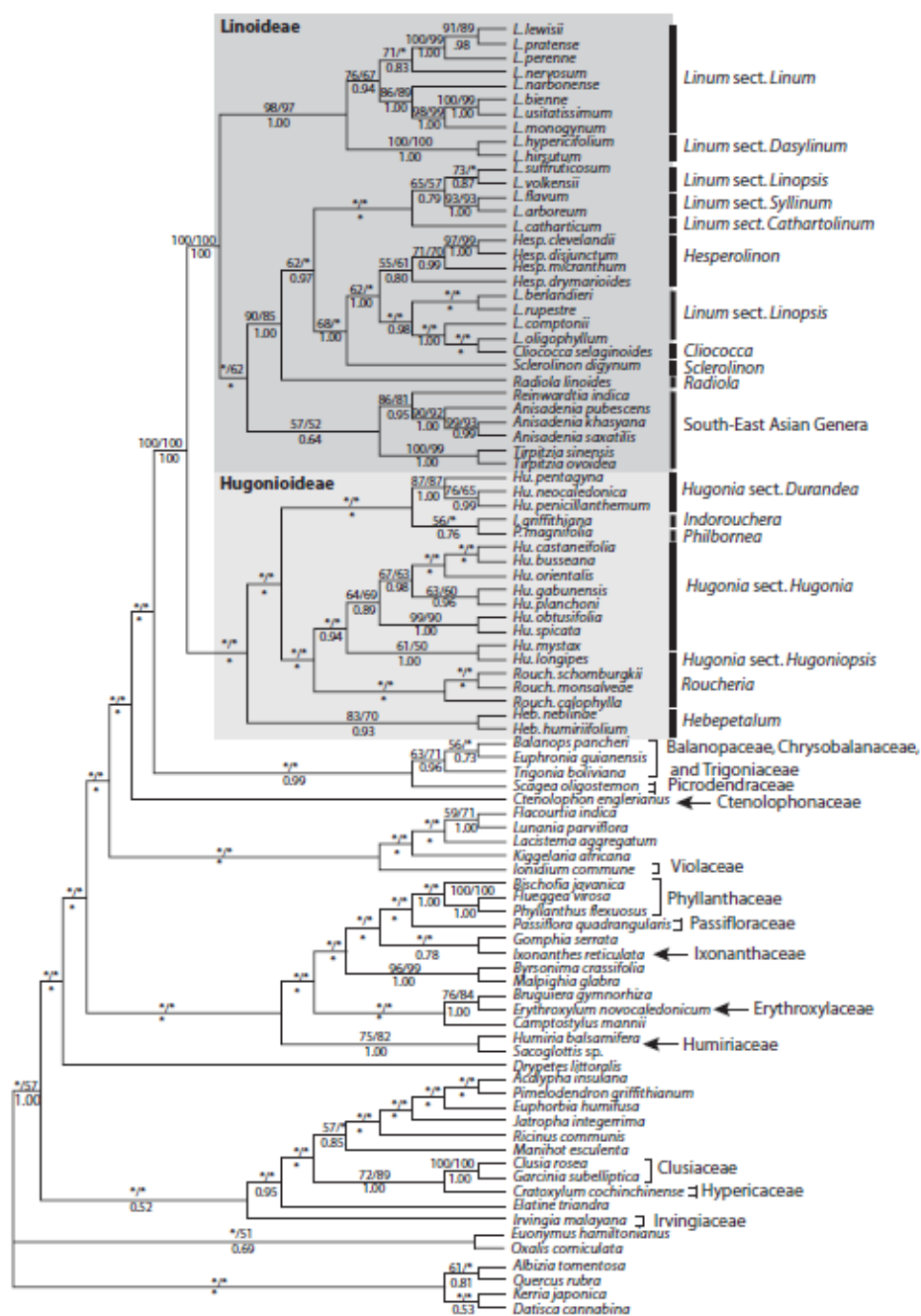


Fig. 1. Árbol filogenético de la familia Linaceae (McDill et al. 2009).

## ANTECEDENTES

Los antecedentes para la familia Linaceae en morfología, anatomía y ontogenia de las flores, como así también sobre la esporogénesis y gametogénesis son escasos. Podemos citar las contribuciones de: Souèges (1937), quién estudió el desarrollo del óvulo en *Radiola linoides* Roth; Dorasami & Gopinath (1945) quienes estudiaron la embriología de *Linum mysorensense* Hyn.; Narayana (1970) quién analizó la megasporogénesis y megagametogénesis en *L. perenne*; Rao & Narayana (1965), estudiaron el desarrollo de la pared de la antera en *Ixonanthes grandiflora* Hochr., *Linum flavum* L. y *Ochthocosmus africanus* Benth.

Con relación a la morfología del polen, debemos mencionar a Erdtman (1966), quien analizó con microscopio óptico los granos de polen de algunas especies de Linaceae, incluyendo *L. usitatissimum* y consideró que esta familia es euripalínica. Estudios basados sobre la morfología del grano de polen en Linaceae fueron aportados por los siguientes autores: Saad (1961a, b; 1962), que estudió los mecanismos de apertura y la estratificación de la exina en algunas especies de Linaceae; Rogers & Xavier (1972), analizaron la evolución de la estructura del polen en *Linum*; Xavier *et al.* (1980), estudiaron la morfología del polen en *Linum*, Secc. *Linastrum*; Rogers (1980) y Dulberger (1981) estudiaron el dimorfismo del polen en especies heterostilas del género *Linum* de la sección *Linastrum*; Punt & Den Breejen (1981), quienes estudiaron el polen de las especies de Linaceae para la Flora del Noroeste de Europa y el de Rogers (1985) quien analizó la morfología polínica del género *Cliococca* Bab., Medeiros Carreiras *et al.* (2005), quienes analizaron la morfología polínica de especies de Linaceae de Amazonia (Brasil). Por último, dos contribuciones recientes sobre la morfología y morfometría del polen en especies de *Cliococca* Bad. y *Linum* de la Argentina, y un estudio comparativo ultraestructural del polen de *Linum burkartii* Mildner y *L. usitatissimum* (Lattar *et al.* 2012 a, b). Con respecto a la ontogenia floral podemos mencionar un trabajo realizado por Schewe *et al.* (2011), estos autores analizaron la ontogenia de las piezas florales en *L. usitatissimum* utilizando solamente microscopía electrónica de barrido.



Este trabajo contempló el estudio de la estructura floral y la embriología en *L. burkartii* y *L. usitatissimum*; para ello se consideraron los siguientes aspectos: morfo-anatomía floral, esporogénesis y gametogénesis. El presente estudio contribuirá a la caracterización de estas especies, y a su vez aportará información para valorar las relaciones filogenéticas propuestas para la familia.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

↻ Estudiar la morfo-anatomía floral y embriología en dos especies del género *Linum*.

### Objetivos específicos

↻ Analizar la estructura floral en ambas especies, evaluando posibles diferencias entre ellas.

↻ Estudiar la microsporogénesis, microgametogénesis y gametofito masculino en las especies seleccionadas.

↻ Estudiar la megasporogénesis, megagametogénesis y gametofito femenino en las especies mencionadas anteriormente.

↻ Evaluar los resultados obtenidos en relación a la taxonomía propuesta para la familia.

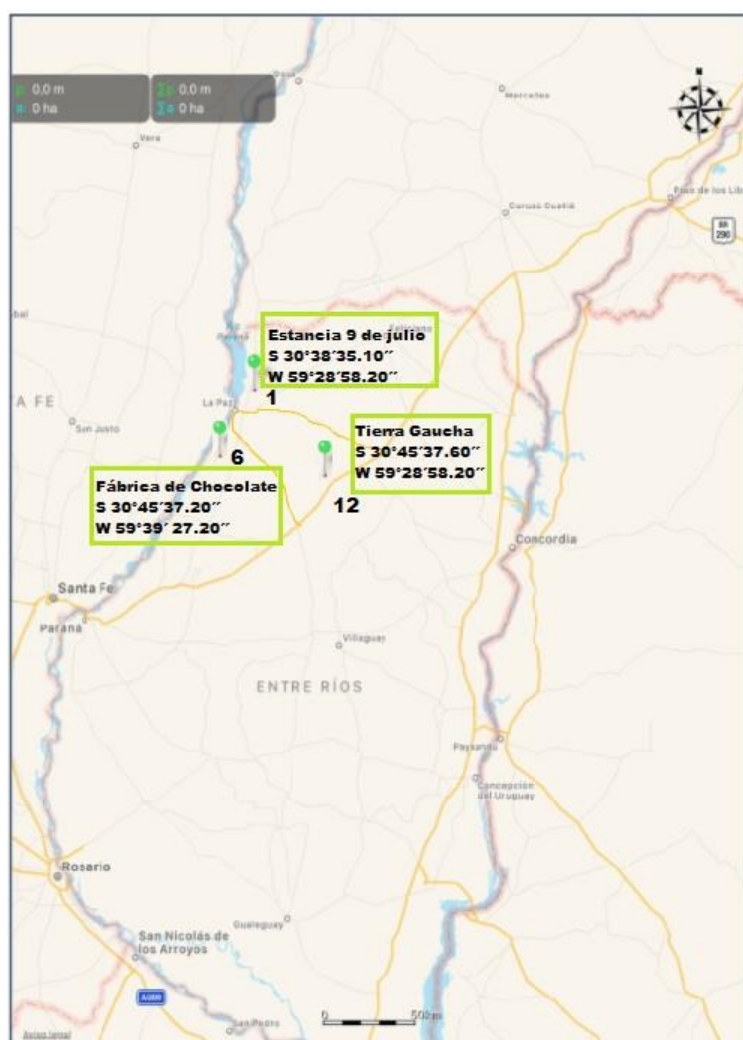
## MATERIALES Y MÉTODOS

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica en relación al tema de investigación propuesto. El Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-UNNE-CONICET) cuenta con una amplia biblioteca Botánica en la que se encuentran obras generales, trabajos específicos y una importante colección de separatas, muchos de ellos relacionados con el tema en estudio. Además, se consultó bibliografía en la biblioteca electrónica de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación y en la del Instituto de Botánica Darwinion (IBODA-CONICET), a los efectos de contar con la mayor cantidad de información actualizada.

## COLECCIÓN DEL MATERIAL

Localidad visitada: La Paz - Entre Ríos, (**Fig. 2**). Se colectaron distintos individuos de las especies estudiadas, se procesaron los ejemplares de herbario para su posterior análisis y se realizaron observaciones ecológicas. Se fijaron botones florales en diferentes estadios de desarrollo y flores en antesis, que fueron utilizados en los estudios anatómicos y ontogenéticos. Los especímenes coleccionados fueron prensados y secados para su posterior etiquetado, montaje e incorporación al Herbario CTES del Instituto de Botánica del Nordeste. Además, se tomaron fotografías de plantas vivas para ilustrar este trabajo.



**Fig.2.** Mapa de la provincia de Entre Ríos, se indican los sitios de colección de los ejemplares analizados.

## Material examinado:

- ✧ *Linum burkartii* Mildner. Argentina. Entre Ríos. Depto. La Paz. En el predio de la fábrica de chocolate, 30°45'37''S, 59°39'27''W, suelo arenoso-gravoso, flores amarillas, fruto tipo cápsula, abundante, 18.XI.2015, *Gustín, P. A., Avalos, A. A., Ferrucci, M. S., Gómez Herrera, J. & Lattar, E. 1* (CTES). Se fijó material en el mismo lugar sin ejemplar testigo el 29.X.2016 y el 24.X.2017.
- ✧ *Linum usitatissimum* L. Argentina. Entre Ríos. Depto. La Paz. La Paz Km 613, a 5 km de la Ruta N°12, 30°38'35,1''S 59°31'9,2''W, suelo agrícola, cultivada, flores azules con fruto de tipo cápsula, abundante, 18.XI.2015, *Gustín, P. A., Avalos, A. A., Ferrucci, M. S., Gómez Herrera, J. & Lattar, E. 2* (CTES); Estancia 9 de Julio, Km 613, a 12 km de La Paz, 30°38'35,1"S, 59°31'9,2"W, suelo agrícola, flores azules con fruto tipo cápsula, abundante, 29.X.2016, *Gustín, P. A., Avalos, A. A., Ferrucci, M. S., Gómez Herrera, J. & Lattar, E. 3* (CTES); Estancia Tierra Gaucha, 24.X.2017, *Lattar, E., Gustín P., A., Ferrucci, M. S. & Gómez Herrera J. 25* (CTES).

## Metodología

*Anatomía:* para la realización de los preparados permanentes, se utilizó material previamente fijado en FAA (5% formol, 90% alcohol, 5% ácido acético). La deshidratación del material se realizó en una serie de deshidratantes histológicos y aclarantes-preimpregnantes de Biopur ® (Gonzalez & Cristóbal, 1997). La impregnación en parafina se hizo según la técnica de Johansen (1940), se colocó en una mezcla de partes iguales de alcohol butírico terciario y aceite de parafina en estufa a 60 °C por 10 h, seguido de dos cambios en parafina entre 10 y 12 h cada uno. La inclusión se realizó en Paraplast. Los cortes se efectuaron con micrótomos rotativos en espesores entre 10-12 µm. Se realizaron cortes transversales seriados para los estudios anatómicos. La coloración se efectuó con Safranina- Astra blue (Luque *et al.* 1996) y posteriormente fueron desparafinados (Pérez & Tomasi, 2002). Los preparados se montaron en bálsamo de Canadá sintético.

*Viabilidad de polen:* se realizó a partir de botones florales (4 de cada especie) coleccionados en el campo. Los mismos fueron fijados en alcohol absoluto-ácido láctico 5:1 y conservados en alcohol 70° a 4 °C hasta el momento del análisis. Se utilizó el método colorimétrico indirecto con carmín acético 2%, para identificar los granos de polen inviables por defectos o insuficiencia de citoplasma o de sustancias de reserva. Los granos coloreados totalmente se consideraron fértiles, y los que no o en parte, estériles. La viabilidad del polen se expresó en porcentaje de granos viables con respecto al total de los granos examinados.

### **Observaciones e interpretaciones**

Para el análisis de los caracteres exomorfológicos, anatómicos y ontogenéticos se utilizó un microscopio estereoscópico Leica MZ6, un microscopio óptico Leica DM LB2, ambos con cámara digital incluida.

Con relación a los caracteres florales, se utilizó el microscopio electrónico de barrido (MEB), JEOL 5800 L V a 10 Kv. (JEOL USA, Peabody, MA, USA) perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional del Nordeste. Las muestras fueron fijadas previamente en FAA, se sometieron en una serie creciente de acetona y luego se secaron con punto crítico con CO<sub>2</sub>. La metalización se llevó a cabo con oro-paladio. Las fotomicrografías se obtuvieron con microscopio electrónico de barrido.

## **RESULTADOS**

### **MORFOLOGÍA FLORAL**

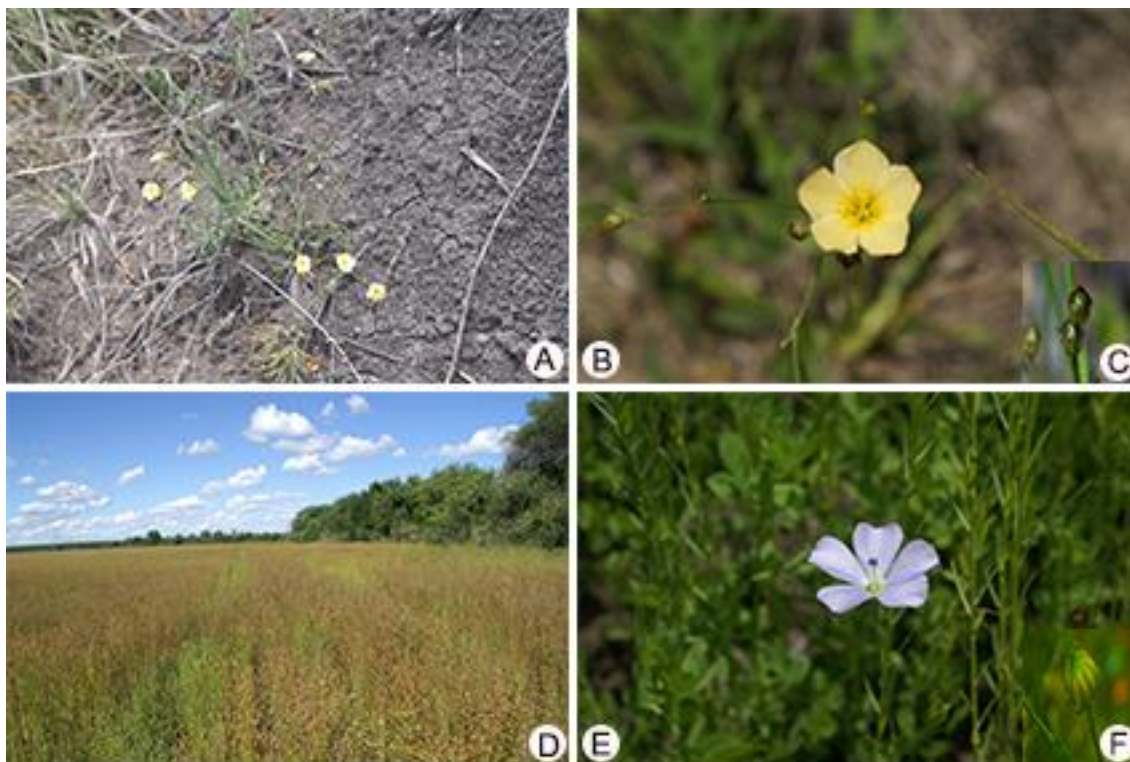
#### ***Linum burkartii* (Fig. 3 A-B)**

Hierba perenne. Tallos gráciles, glabriúsculos, distancia de los entrenudos de  $\pm 2,6$  cm. Hojas alternas de 6,3-10 mm long.  $\times$  1-3 mm lat., elíptico-lineares, consistencia papiráceo-cartácea, sésiles, ápice atenuado y base decurrente, distanciadas en la parte basal y más próximas en el ápice, estípulas ausentes. Inflorescencias amplias, laxas, tirsoideas, cimoidales, cincinadas. Flores perfectas, con simetría actinomorfa; homostilas. Cáliz pentámero, dialisépalo,

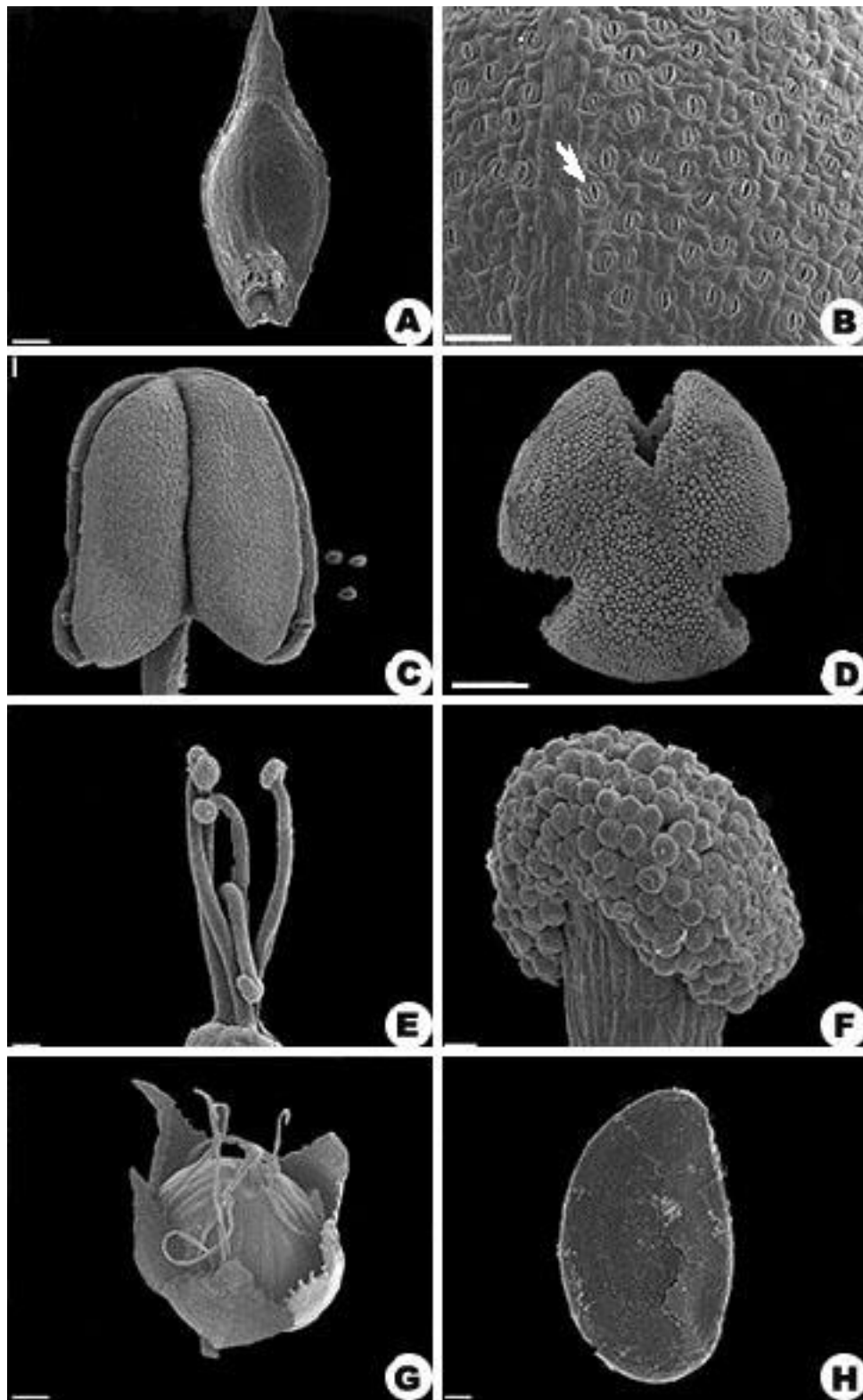
sépalos ovados a romboidales, de 3,5-4 mm long. × 2 mm lat., denticulado-glandulosos con papilas muy prominentes sobre el margen. Corola amarilla, pentámera, dialipétala, pétalos efímeros obovados, de 8-9 mm long. × 4 mm lat. Androceo con 5 estambres de ± 3,8 mm long., persisten durante la formación del fruto, anteras bitecas de ± 2 mm long., dorsifijas, dehiscencia longitudinal. Gineceo con ovario súpero, ovoide, 5 carpelos, cada uno dividido por un falso tabique, glabro, placentación axilar, estilos de 3,5-4,5 mm long., glabros y estigma (5 ramas) glanduloso con presencia de papilas, la superficie estigmática de contorno subcircular. Fruto cápsula, globosa de 3-3,5 mm long. × 2-2,5 mm lat., cáliz persistente en el fruto. Semillas de 2 mm long., castaño-oscuros, opacas, con episperma liso.

*Linum usitatissimum* (**Fig. 3 D-F**)

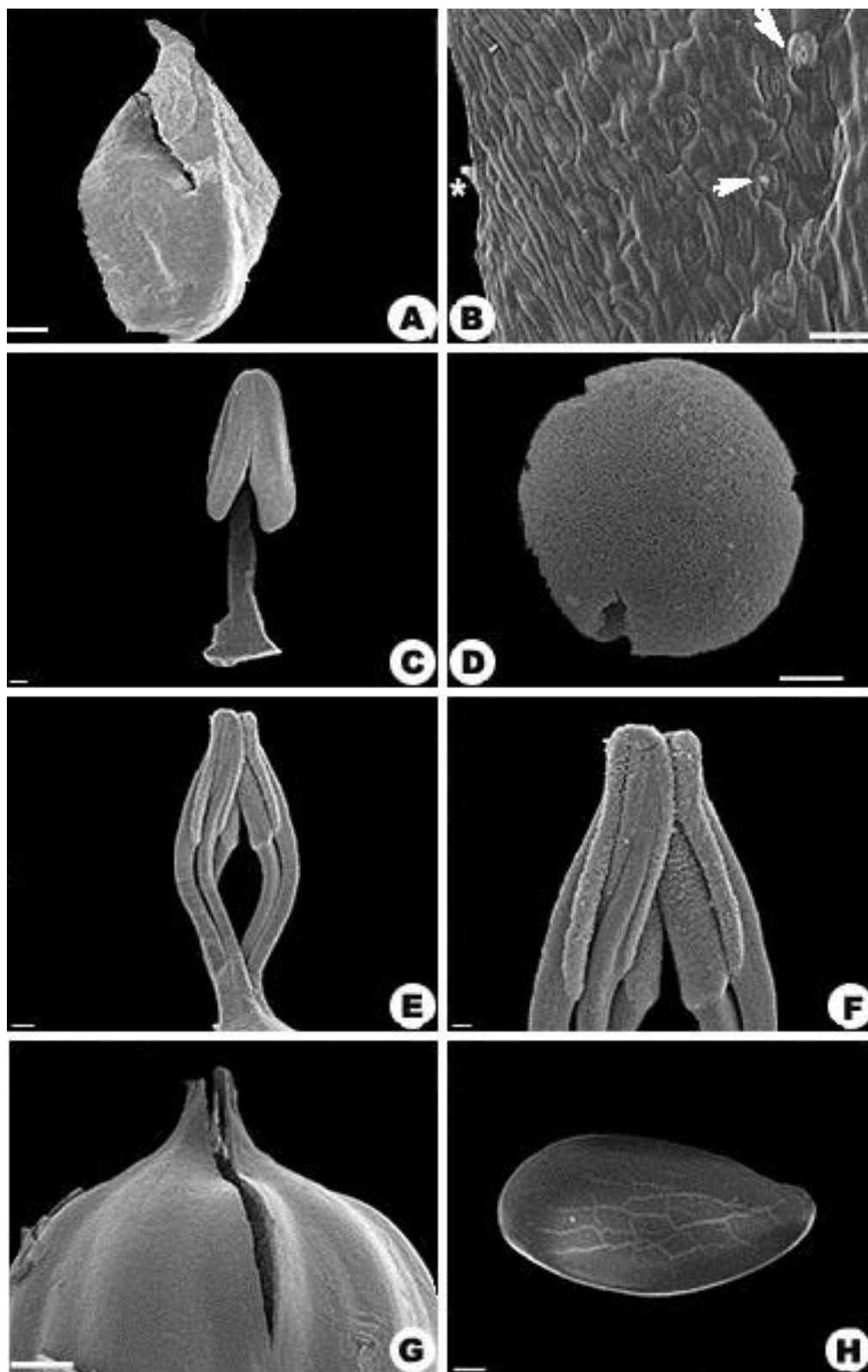
Hierba anual de 0,6-1 m de alt. Tallos simples o ramificados cerca de la base, de forma rolliza, entrenudos separados entre sí a ± 4,6 cm, diámetro 1 mm. Hojas opuestas de 10-30 mm long. × 1,5-3 mm lat., linear-elípticas, consistencia papiráceo-coriácea, margen entero, atenuadas en el ápice y cuneadas en la base, estípulas ausentes. Inflorescencias laxas, paniculiformes. Flores vistosas, pequeñas a medianas, perfectas; homostilas. Cáliz pentámero, dialisépalo, sépalos ovados de 6-9 mm long. × 2 mm lat., de margen membranáceo con papilas poco prominentes. Corola azul, pentámera, dialipétala, pétalos obovados, de 12-15 mm long. × 5 mm lat. Androceo con 5 estambres de 7-10 mm de long., cuya base está ensanchada formando un anillo que se fusiona alrededor de la base del gineceo, anteras bitecas de 2 mm de long., dorsifijas, dehiscencia longitudinal. Gineceo con ovario súpero, ovoide, 5 carpelos, cada uno dividido por un falso tabique, glabro, placentación axilar, estilos de ± 4 mm de long., glabros y estigmas (5), glandulosos con presencia de papilas, la superficie estigmática de contorno subrectangular. Fruto cápsula de 6-9 mm diám., globosas. Semillas de ± 5 mm long., castaño-claras, brillosas, con episperma liso.



**Fig. 3. A-C. *L. burkartii*:** **A-** Aspecto general de la especie en su hábitat. **B-** Detalle de la flor. **C-** Fruto de tipo cápsula. **D-F. *L. usitatissimum*:** **D-** Cultivo de lino en época de fructificación y cosecha. **E-** Detalle de la flor, se observa la corola azul. **F-** Detalle del fruto inmaduro de tipo cápsula.



**Fig. 4. Morfología floral de *L. burkartii*:** **A-** Aspecto general de la cara adaxial de sépalo. **B-** Detalle de la cara abaxial de sépalo, se observan numerosos estomas (flecha). **C-** Dehiscencia longitudinal de antera, se observa la liberación de los granos de polen. **D-** Detalle de grano de polen maduro. **E-** Aspecto general del gineceo, se observa parte del ovario, estilos y estigma. **F-** Detalle de las papilas que cubren la parte receptiva del estigma. **G-** Aspecto general del fruto de tipo cápsula, se observa que el cáliz es persistente. **H-** Semilla con episperma liso. Escalas: **A:** 500  $\mu\text{m}$ ; **B:** 50  $\mu\text{m}$ ; **C:** 100  $\mu\text{m}$ ; **D:**  $\mu\text{m}$ ; **E:** 200  $\mu\text{m}$ ; **F:** 20  $\mu\text{m}$ ; **G:** 500  $\mu\text{m}$ ; **H:** 200  $\mu\text{m}$ .



**Fig.5. Morfología floral de *L. usitatissimum*:** **A-** Aspecto general de la cara abaxial de sépalo. **B-** Detalle de las células epidérmicas propiamente dichas, algunos estomas (flechas) y glándulas en el margen (asterisco). **C-** Aspecto general del estambre. **D-** Detalle del grano de polen maduro. **E-** Aspecto general del gineceo, se observan estilos y estigmas. **F-** Detalle del estigma, se observa que la superficie del estigma se encuentra cubierta de papilas. **G-** Parte del fruto de tipo cápsula. **H-** Aspecto general de semilla con episperma liso. Escalas: **A:** 200 µm; **B:** 20 µm; **C:** 200 µm; **D:** µm; **E:** 200 µm; **F:** 100 µm; **G** y **H:** 500 µm.



**Tabla 1.** Cuadro comparativo de la morfología floral entre las distintas especies de *Linum*.

| Especies                     | Forma de los sépalos | Margen de los sépalos | Color de la corola | Estaminodios | Tipo de flores | Forma del estigma | Nº de colpos | Color de la semilla | Referencias                               |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|--------------|----------------|-------------------|--------------|---------------------|---|
| <i>Linum burkartii</i>       | Ovados o romboidales | Con glándulas         | Amarillo           | Ausente      | Homostilas     | Subcircular *     | 3            | Castaña oscuro      | <b>Tesina, 2018 *</b><br>Bacigalupo, 2005 |
| <i>L. usitatissimum</i>      | Ovados               | Con glándulas         | Azul               | Ausente      | Homostilas     | Subrectangular *  | 3            | Marrón claro        | <b>Tesina, 2018 *</b><br>Basigalupo, 2005 |
| <i>L. angustifolium</i> Huds | -                    | Sin glándulas         | Azul claro         | Ausente      | -              | -                 | 3            | Marrón claro        | Gill, 1987                                |
| <i>L. bienne</i> Mill        | -                    | Sin glándulas         | Azul claro         | Ausente      | -              | -                 | 3            | Marrón claro        | Gill, 1987                                |
| <i>L. catharticum</i> L.     | -                    | Con glándulas         | Blanco             | Presente     | -              | -                 | 3            | Marrón              | Gill, 1987                                |
| <i>L. hirsutum</i> L.        | -                    | Con glándulas         | Rojo               | Presente     | -              | -                 | 3            | Marrón              | Gill, 1987                                |
| <i>L. perenne</i> L.         | -                    | Sin glándulas         | Azul               | Presente     | Heterostilas   | -                 | 3            | Marrón              | Gill, 1987<br>Darwin, 1864                |

## ANATOMÍA

### Estudios embriológicos

#### *Desarrollo de la pared de la antera en las especies estudiadas*

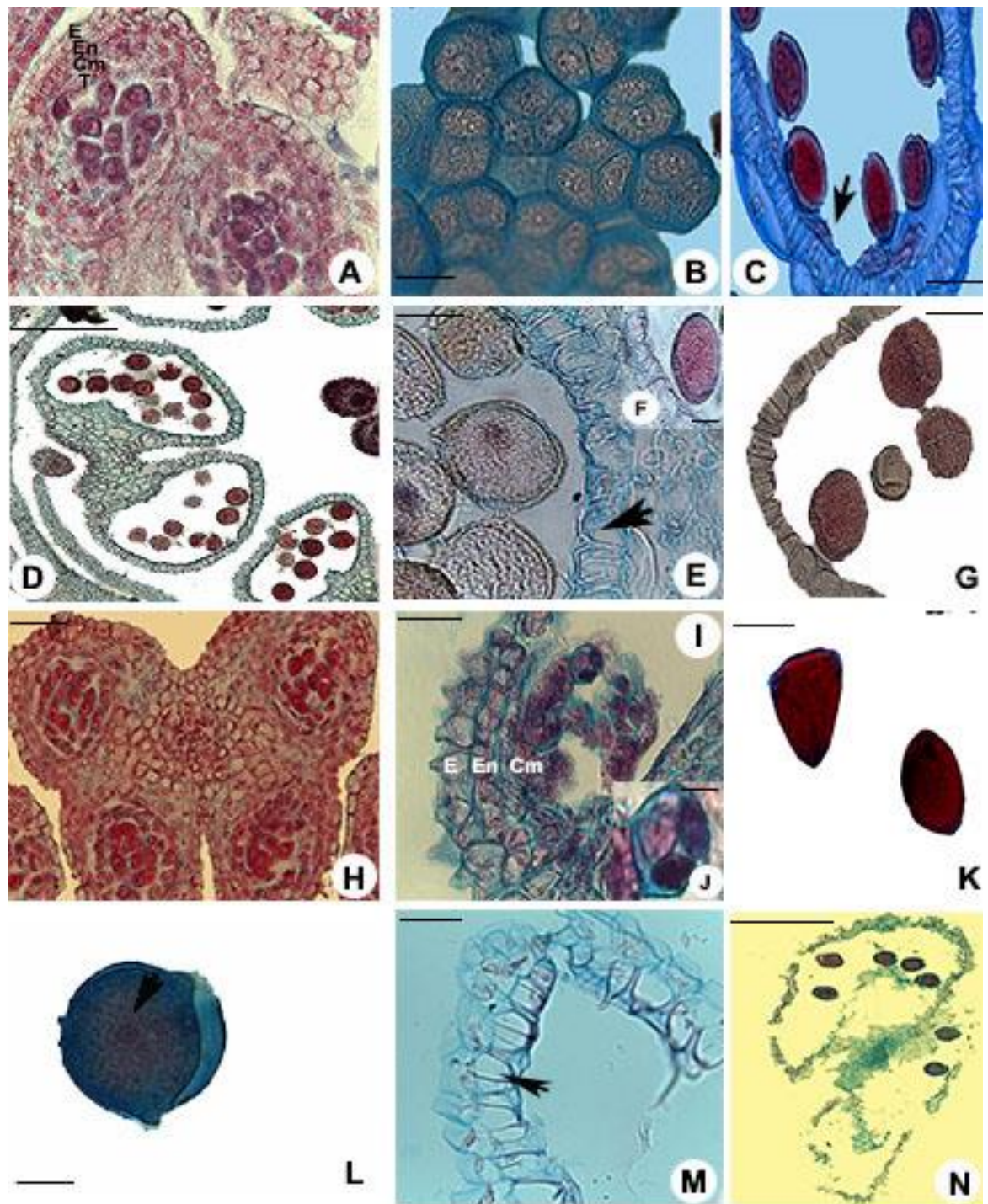
El desarrollo de pared de la antera en ambas especies corresponde al tipo básico. En corte transversal, las anteras de ambas especies son tetrasporangiadas (**Fig.6 A, H**). La pared de la antera joven desde afuera hacia adentro consta de: epidermis uniestratificada, una capa de endotecio, dos capas de células medias y una capa de tapete secretor (**Fig.6 A, I**).

#### *Microsporogénesis, microgametogénesis gametofito masculino*

La microsporogénesis comienza con la meiosis de las células madres de las micrósporas y termina con la formación de micrósporas haploides polarizadas. A continuación se detalla el proceso que ocurre en *L. burkartii* y *L. usitatissimum*. El tejido esporógeno se encuentra formado por células con citoplasma denso y paredes celulares delgadas, el mismo carece de espacios intercelulares. Las células madres de las micrósporas (**Fig.6 A, H**) se preparan para la meiosis, y la calosa se deposita entre la pared primaria y el plasmalema. Las divisiones meióticas de las células madres de las micrósporas

son del tipo simultáneo y, como resultado se obtienen tétrades del tipo tetraédrico (**Fig.6 B, J**). Cada tétrada se encuentra rodeada por una pared de calosa y cuando ésta se degrada, se observa la liberación de las micrósporas jóvenes en el lóculo de la antera (**Fig.6 C, K**).

La liberación de las micrósporas de tétradas indica el inicio de la microgametogénesis, se produce una división mitótica del núcleo originando una célula de mayor volumen, la célula vegetativa y una de menor volumen, la célula generativa. El endotecio presenta modificaciones, las células de este tejido originan engrosamientos fibrilares en las paredes radiales, en *L. burkartii* comienzan a desarrollarse en el estadio de granos de polen jóvenes (**Fig.6 D, E**), mientras que en *L. usitatissimum* en el estadio de granos de polen maduros (**Fig.6 M**). El tapete de las especies analizadas es de tipo secretor (**Fig.6 C**). Los núcleos de las células tapetales pueden dividirse o no, en *L. burkartii* las células tapetales son uninucleadas mientras que en *L. usitatissimum* son binucleadas. Por último, los granos de polen de las especies estudiadas se liberan en estado bicelular (**Fig.6 F-G, L, N**).



**Fig 6.** **A-G** *L. burkartii*: **A-** Aspecto general del corte transversal de la antera, observándose la epidermis uniestratificada, el endotecio, capas medias, tapete y las células madres de las microsporas. **B-** Detalle de las tétrades. **C-** Microsporas jóvenes, nótese restos de tapete secretor (Flecha). **D-** Aspecto general de granos de polen jóvenes. **E-** Detalle de los engrosamientos del endotecio en forma de "U" (Flecha). **F-** Detalle del grano de polen unicelular. **G-** Granos de polen maduros en antera madura. **H-N** *L. usitatissimum*: **H-** Aspecto general del corte transversal de antera joven, observándose las células madres de las microsporas. **I-** Detalle de la epidermis papilosa, el endotecio sin engrosamientos, capas medias y tétrades. **J-** Detalle de una tétrade. **K-** Detalle de microsporas jóvenes libres. **L-** Detalle de grano de polen maduro uninucleado (Flecha). **M-** Detalle de los engrosamientos del endotecio en forma de "U" (Flecha) en una antera dehiscente. **N-** Aspecto general de los granos de polen maduros liberados en una antera dehiscente. Escalas: **A-C, E-G:** 50  $\mu$ m; **D:** 200  $\mu$ m; **H-M:** 50  $\mu$ m; **N:** 200  $\mu$ m. *Abreviaturas:* E (Epidermis), En (Endotecio), Cm (Capas medias), T (Tapete).

### Viabilidad de polen (Tabla 2)

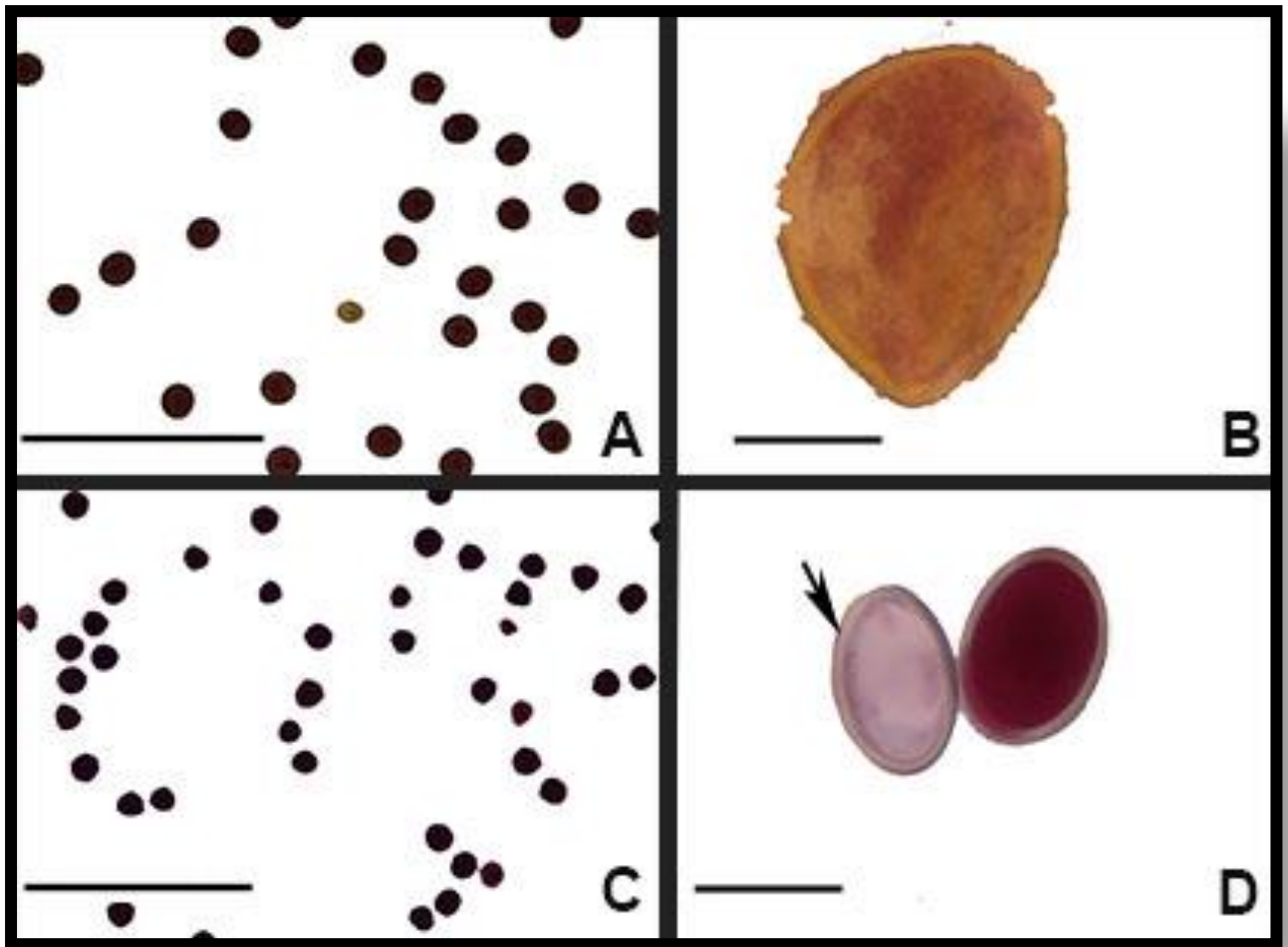
La viabilidad del polen determinada por método colorimétrico fue de 94,2 % para *L. burkartii* (**Fig. 7; Fig. 8 A**), mientras que en *L. usitatissimum* fue del 81,5 % (**Fig. 7; Fig. 8 C**). En algunas flores de *L. burkartii*, los granos de polen se observaron débilmente coloreados, lo cual indica que son inviables (representando el 5,73%), mientras que en *L. usitatissimum* representa el 18,5% (**Fig. 7; Fig. 8 B, D**).

**Tabla 2.** Porcentaje y número de granos de polen viables e inviables en ambas especies.

| Especie                 | Viables | Porcentaje | No viables | Porcentaje |
|-------------------------|---------|------------|------------|------------|
| <i>L. burkartii</i>     | 2745    | 94,2%      | 167        | 5,73%      |
| <i>L. usitatissimum</i> | 2176    | 81,5%      | 493        | 18,5%      |



**Fig. 7.** Gráfico de barras de los valores sobre viabilidad de polen.



**Fig.8.** Viabilidad del polen por método de coloración con carmín glicerina. **A-B. *L. burkartii*:** **A-** Granos de polen viables. **B-** Detalle de un grano de polen inviable, se aprecia el citoplasma contraído. **C-D. *L. usitatissimum*:** **C-** Aspecto general de los granos de polen viables. **D.** Detalle de polen viable y no viable (flecha). Escalas: **A, C:** 200  $\mu$ m; **B, D:** 50  $\mu$ m.

### *Caracteres generales del óvulo*

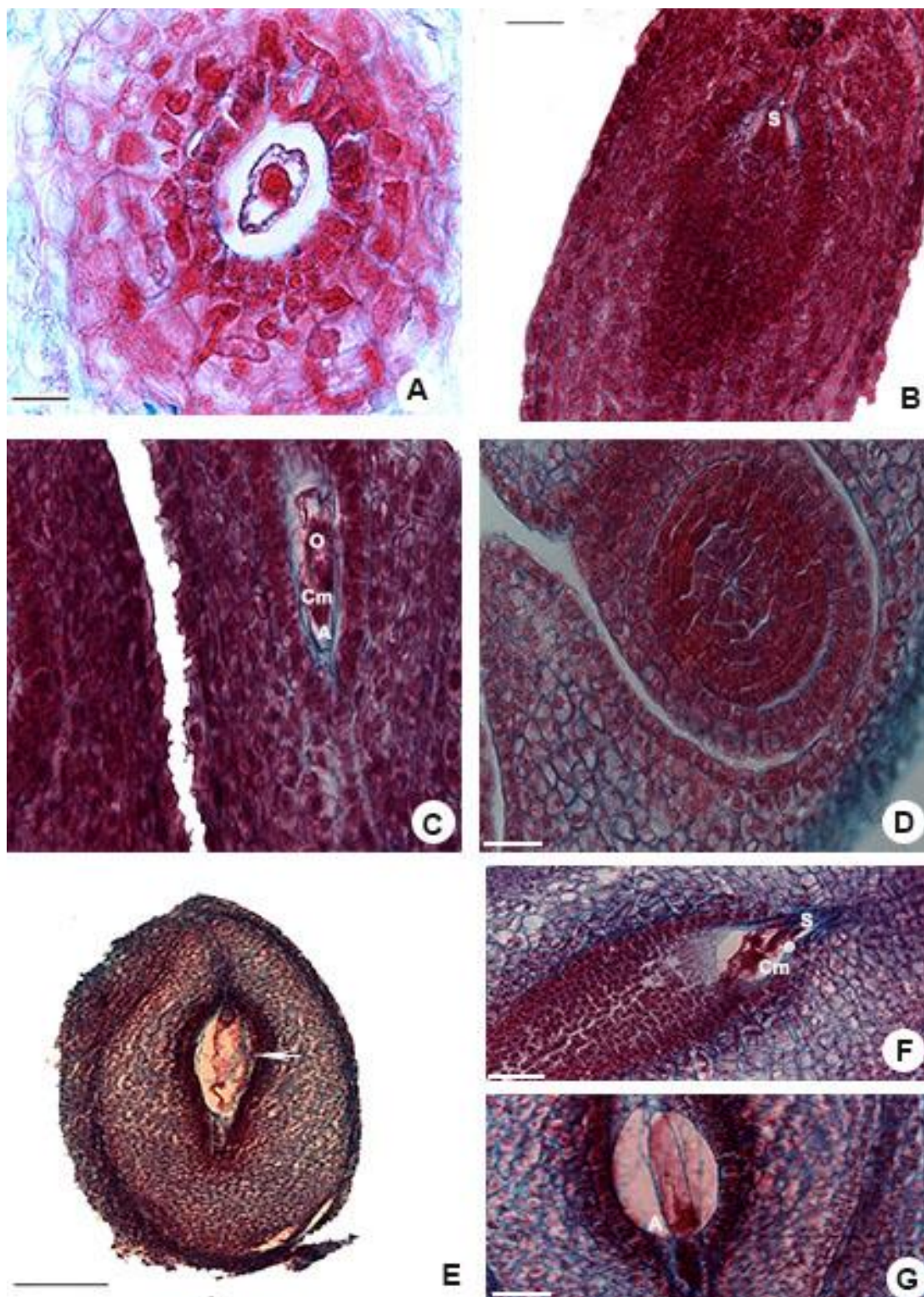
En *L. burkartii* y *L. usitatissimum*, el óvulo maduro es anátropo, bitégmico y crasinucelado. El micrópilo en las especies estudiadas está formado por los dos tegumentos, externo e interno.

### *Megasporogénesis, Megagametogénesis y gametofito femenino (Fig.9 A-G)*

En *L. burkartii* y *L. usitatissimum*, la célula madre de la megáspora, luego de la meiosis, da lugar a una tétrade lineal de megásporas. En ambas especies, la citocinesis tanto de la meiosis I como meiosis II es transversal. De estas megásporas, la más interna, es decir la más cercana a la calaza es viable y funcional, dando origen al gametofito femenino, mientras que las restantes degeneran. La megáspora funcional se agranda rápidamente y por tres cariocinesis sucesivas se origina un saco embrionario 2- nucleados, 4-

nucleados y 8- nucleados, respectivamente. El gametófito femenino joven en las especies estudiadas en el presente trabajo consiste de siete células: la oósfera, dos sinérgidas, la célula central binucleada y tres antípodas. Las sinérgidas presentan un aparato filar muy pequeño. La oósfera es escasamente vacuolada y su núcleo ocupa una posición calazal. La célula media es muy vacuolada y posee dos núcleos polares. Las antípodas son pequeñas y se ubican en el extremo calazal, persisten poco tiempo durante el desarrollo en *L. burkartii* mientras que en *L. usitatissimum* son conspicuas y permanentes. El tipo de desarrollo del saco embrionario de las especies analizadas corresponde al tipo Polygonum.





**Fig 9. A-C *L. burkartii*:** **A-** Detalle de la megáspora calazal. **B-** Detalle de las sinérgidas y aparato filar. **C-** Detalle de parte del saco embrionario de tipo Polygonum, con ovocélula, célula del medio y antípodas pequeñas. **D-G *L. usitatissimum*:** **D-** Corte transversal de un primordio sin división. **E-** Aspecto general del saco embrionario maduro de tipo Polygonum (Flecha). **F-** Parte del saco embrionario, observándose las sinérgidas, ovocélula y célula del medio. **G-** Detalle de las antípodas. Escalas: **A-C:** 50 µm; **D, F-G:** 50 µm; **E:** 500 µm. Abreviaturas: **S** (Sinérgidas), **O** (Ovocélula), **Cm** (Célula del medio), **A** (Antípodas).

## DISCUSIÓN

El presente estudio sobre la estructura floral y la embriología aporta datos de interés, los cuales permiten caracterizar a cada una de las especies analizadas como así también inferir las relaciones filogenéticas dentro de la taxonomía actual de la familia.

### *Estructura Floral*

Linaceae generalmente presenta flores con simetría actinomorfa (McDill *et al.* 2009), este carácter coincide con lo observado en las especies analizadas en el presente trabajo. Sin embargo, Schewe *et al.* (2011), indican que algunas especies de la subfamilia Hugonoideae presentan flores zigomorfas.

Un carácter interesante en la familia es la presencia de heterostilia. Históricamente, el género *Linum* ha sido estudiado por el mecanismo de la heterostilia en muchas especies (Darwin, 1864). Las especies analizadas en este trabajo, *L. burkartii* y *L. usitatissimum* presentaron homostilia. En un contexto macroevolutivo, la presencia de heterostilia ha sido considerada como un carácter ancestral dentro del género (Rogers, 1982). Las especies con heterostilia están confinadas al Viejo Mundo, y han sido observadas en otros géneros de las subfamilias Hugonoideae y Linoideae (Xavier *et al.* 1980; Rogers, 1982; McDill *et al.* 2009). Por otra parte, Lattar *et al.* (2012) analizaron la morfología polínica de las especies argentinas de *Linum*, las autoras indicaron que las especies estudiadas son homostilas, coincidiendo con Rogers (1982) que indica que las mismas tienen una distribución cosmopolita pero están principalmente en el Nuevo Mundo.

En miembros de Linaceae, la tendencia es presentar cáliz y corola pentámera, este dato coincide con lo observado en *L. burkartii* y *L. usitatissimum*. En relación al patrón del desarrollo de los verticilos de protección de las especies analizadas aquí, en ambas los verticilos florales se desarrollan al mismo tiempo.

Con relación a la morfología floral, los caracteres comunes en ambas especies de *Linum* estuvieron dados por el tipo de inflorescencia, la simetría, el número de piezas florales, el tipo de antera, de estigma y la dehiscencia del fruto, estos caracteres coinciden con lo observado por Schewe *et al.* (2011),



quienes estudiaron la ontogenia de las piezas florales en poblaciones europeas heterostilas de *L. usitatissimum*. Sin embargo, otras especies como *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. catharticum*, *L. hirsutum* y *L. perenne*, se diferencian por otros caracteres como el margen de los sépalos, color de la corola, presencia de estaminodios y color de la semilla (Singh, 1987). En cambio, los caracteres que las diferencian a las especies estudiadas están dados por (**Tabla 1**): el color de las flores (amarillas vs. azules), la forma de los sépalos (ovados a romboidales vs. ovados), la presencia de papilas en los márgenes de los sépalos (notables vs. inconspicuas).

### *Embriología*

Con relación al número de estambres y a la estructura de la antera dentro de la familia Linaceae se presenta el mismo patrón, las especies estudiadas en la presente tesina presentan anteras bitecas, son dorsifijas y la dehiscencia es longitudinal, coincidiendo con lo observado por Singh (1987), Bacigalupo (2005) y Schewe *et al.* (2011).

En relación a la morfología y anatomía del estigma y estilo de Linaceae, los antecedentes son muy escasos, casi nulos. En esta tesina se detalla el contorno del estigma que en *L. burkartii* es circular, mientras que en *L. usitatissimum* es oblongo. De acuerdo al criterio de clasificación de (Heslop-Harrison & Shivanna 1977; Heslop-Harrison, 1981), estigmas húmedos o secos, las especies aquí analizadas presentan estigmas húmedos. Se destaca que en la familia no hay antecedentes relacionados con el tema, por lo que sería interesante continuar con el estudio estructural y ultraestructural del estilo y estigma.

Los caracteres embriológicos han sido de utilidad en la diagnosis de los grupos de alto rango taxonómico (Furness & Rudall, 1999; Furness *et al.* 2002). El desarrollo de la antera en *L. burkartii* y *L. usitatissimum* corresponde al tipo básico (Davis, 1966). Este carácter es compartido por otras especies de la subfamilia Hugonoideae (Jhori, 1992). En las especies de *Linum* analizadas aquí, la citocinesis es de tipo simultánea dando lugar a tétrades de tipo tetraédricas. El patrón de formación de las micrósporas en las especies estudiadas sería un carácter plesiomórfico de las angiospermas (Nadot *et al.*

2008), siendo común para todas las eudicotiledóneas (Furness *et al.* 2002) y estaría asociado con las aperturas tricolpadas del polen y sus derivados, tales como las tricolporadas (Furness & Rudall, 1999). Las especies analizadas en este trabajo presentan granos de polen tricolpados (Lattar *et al.* 2012 a, b). Otro carácter relevante es la formación de los engrosamientos fibrilares del endotecio en relación al desarrollo del polen de las especies analizadas. En *L. burkartii* comienzan a desarrollarse en el estadio de granos de polen jóvenes, mientras que en *L. usitatissimum* en el estadio de granos de polen maduros.

El tapete está formado por una capa de células especializadas que rodea al tejido esporógeno. Presenta importancia nutricional y produce diversas enzimas y precursores de exina (Chapman, 1987; Pacini & Franchi, 1993; Pacini *et al.* 1985; Pacini, 1990). El tapete en las angiospermas puede ser de dos tipos: ameboidal o secretor, aunque se ha señalado la presencia de un tipo intermedio denominado invasivo no sincicial (Furness & Rudall, 2001; Galati *et al.* 2007). En las especies estudiadas en este trabajo se observa que el tapete es de tipo secretor, siendo el tipo más común en las eudicotiledóneas (Furness & Rudall, 2001; Pacini, 1990). Las células tapetales en *L. burkartii* son uninucleadas mientras que en *L. usitatissimum* son binucleadas, el número de núcleos en las células tapetales sería un carácter destacable para diferenciar a ambas especies. Con respecto a la viabilidad del polen, en *L. usitatissimum* mostró un 81,5 % de granos de polen viables y 18,5% de granos de polen no viables, mientras que en *L. burkartii* se registró un 94, 2% de granos de polen viables y 5,73 % de polen no viable (**Tabla 2**).

Con relación a la estructura del óvulo, las especies estudiadas presentan óvulos anátropos, bitégmicos y crasinucelados coincidiendo con Schewe *et al.* (2011). El micrópilo está formado por los dos tegumentos, externo e interno. Según Davis (1966) y Jhori (1992), la presencia de hipóstasis en la familia Linaceae es un carácter poco frecuente, en este trabajo no se ha observado. La ubicación de las antípodas en las especies estudiadas es en el polo calazal, coincidiendo con las observaciones de Davis (1966) y Jhori (1992), las antípodas son pequeñas y efímeras en *L. burkartii*, mientras que en *L. usitatissimum* son conspicuas y persistentes, por lo que se estima que las mismas tendrían funciones nutricias durante el desarrollo del embrión. Con

relación al desarrollo del megagametófito, las especies analizadas tienen un desarrollo monospórico, por lo que el megagametófito es de tipo Polygonum. Esto coincide con las observaciones de Jhori (1992) y Schewe *et al.* (2011) realizadas en especies de Hugonoideae.

## CONCLUSIÓN

McDill en 2009 ha propuesto dentro de Linaceae una nueva subdivisión en dos subfamilias: Hugonoideae y Linoideae, basada en datos moleculares y morfológicos. En la subfamilia Linoideae se incluyen a las especies del género *Linum*. Los resultados aquí obtenidos como la morfología floral y los caracteres embriológicos, son significativos para apoyar la reciente clasificación de la familia Linaceae. Los datos derivados de esta tesina son de gran importancia para el conocimiento de la morfología floral y de los procesos embriológicos en *Linum* y esto puede contribuir a nuevas vías de estudios como la susceptibilidad polen-pistilo en los cultivares de lino, ya que podrían afectar el rendimiento y/o calidad de los mismos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bacigalupo, N. M.** 2005. Linaceae. In Bacigalupo (Ed.) Flora II. Entre Ríos: Colección CI, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 6 (4b): 41-48.
- Barreiro, R. A. & G. E. Sánchez Vallduvi.** 2002. Delimitación del periodo crítico de competencia de malezas en cultivo de lino (*Linum usitatissimum*). Planta *Daninha Viciosa-MG* 20: 399-403.
- Chapman, G.** 1987. The tapetum. *Intern. Revie. Cyt.* 107: 111-125.
- Darwin, C.** 1864. On the existence of two forms on their reciprocal sexual relations, in several species of the genus *Linum*. *J. Linn. Soc. Lond. Bot.* 7: 69-83.
- Davis, G. L.** 1966. Systematic Embryology of the Angiosperm; (New York, U.S.A.: Wiley)
- Dorasami, L. S. & G. Gopinath.** 1945. An embryological study of *Linum mysorense* Hyn. *Proc. Indian Acad. Sci. B.* 22: 6-9.

- Dulberger, R.** 1981. Dimorphic exine sculpturing in three distylous species of *Linum* (Linaceae). *Pl. Syst. Evol.* 139: 113-119.
- Erdtman, G.** 1966. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. Hafner Publ. Co., New York.
- Furness, C. & P. Rudall.** 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Ann. Bot.* 84: 475-499.
- Furness, C. A. & P. J. Rudall.** 2001. The tapetum in basal angiosperms: early diversity. *Int. J. Plant Sci.* 162: 375-392.
- Furness, C. A., P. J. Rudall & B. Sampson.** 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 163: 235-260.
- Galati, B. G., M. M. Gotelli & S. Rosenfeldt.** 2007. Pollen, Tapetum and Orbicule Development in *Modiolastrum malvifolium* (Malvaceae). *Ann. Bot.* 99: 755-763.
- Gill, K. S.** 1987. Linseed publications and information division. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
- Gonzalez, A. M. & C. L. Cristóbal.** 1997. Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhostzkyana* (Sterculiaceae). *Bonplandia* 9 (3-4): 287-294.
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York and London. 511pp.
- Johri, B. M.** 1992. Embriology of Angiosperms. Springer, Berlín-Heidelberg.
- Lattar, E., B. G. Galati & M. S. Ferrucci.** 2012. A comparative ultraestructural study of the pollen of *Linum burkartii* and *L. usitatissimum* (Linaceae). *Torr. Soc. Bot.* 139 (2): 113-117.
- Lattar, E., S. M. Pire, M. M. Avanza & M. S. Ferrucci.** 2012. Pollen analysis in some species of Linaceae- Linoideae from Argentina. *Palynology* 36 (2): 254-263.
- Lenzi de Almeida, K. C., F. S. Fernandes, G. T. Bonaventura & M. A. Guzmán- Silva.** 2008. Efecto de la semilla de linaza (*Linum usitatissimum*) en el crecimiento de ratas wistar. *Rev. Chil. Nutr.* 35(4): 23-26.

- Luque R., H.C. Souza & J. E. Kraus.** 1996. Métodos de coloração do Roeser (1972)- Modificado- E Kropp (1972), visado a substituição do azul de astra por azul de alciano 8GS on 8GX. *Acta Bot. Bras.* 10 (2): 199-212.
- McDill J., M. Reppinger, B. Simpson & J. W. Kadereit.** 2009. The phylogeny of *Linum* and Linaceae Subfamily Linoideae, with implications for their systematics, biogeography and evolution of heterostily. *Syst. Bot.* 34 (2): 386-405.
- Medeiros Carreira L.M, Araújo Barata FC, Raposo R.C.O, Lobato E.S.P.** 2005. Morfología Polínica de Linaceae de Amazonia Brasileira. Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi série Ciencias Naturais, Belem 1: 49-59.
- Nadot, S. Furnes, J., Sannier, L. Penet, S. Triki-Teurtroy, B. A. bert & A. Ressayre.** 2008. Phylogenetics comparative of microsporogenesis in angiosperms with focus in monocots. *Ann Bot.* 95: 14-26.
- Narayana, L. L.** 1970. Linaceae. In: Symposium on comparative Embryology of Angiosperms. *Delhi:* 127-132.
- Pacini, E.** 1990. Tapetum and microspore function. In: Blackmore, S., Knox, R. B. (Eds.), Microspores: Evolution and Ontogeny. Academic Press, London 213-237 pp.
- Pacini, E. & G. G. Franchi.** 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Pl. Syst. Evol.* 7: 1-11.
- Pacini, E., Franchi, G. G. & Hesse, M.** 1985. The tapetum: its form, function and posible phylogeny in Embriophyta. *Plant Syst. Evol.* 149: 155-185.
- Pérez, A. & V. H. Tomasi.** 2002. Tinción con Azul Brillante de Cresilo en secciones vegetales con parafina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 37 (3-4): 211-215.
- Punt, W. & P. Den breejen.** 1981. The northwest european pollen flora, 27. Linaceae. *Rev. Palynol.* 33 (1-2), 75-115.
- Rao, D. & L. L. Narayana.** 1965. Vascular anatomy of Humiriaceae. *Curr. Sci.* 34: 383- 384.

- Rogers, C. M. & K. S. Xavier.** 1972. Parallel evolution in pollen structure in *Linum*. *Grana* 12: 41-46.
- Rogers, C. M.** 1980. Pollen dimorphism in distylous species of *Linum* sect. *Linastrum* (Linaceae). *Grana* 19: 19-20.
- Rogers, C. M.** 1985. Pollen morphology of the monotypic genus *Cliococca* (Linaceae). *Grana* 24: 121-123.
- Saad, S. I.** 1961 a. Phylogenetic development in the apertural mechanisms of *Linum* pollen grains. *Pollen et Spores* 1: 33-43.
- Saad, S. I.** 1961 b. Pollen morphology and sporoderm stratification in *Linum*. *Grana Palynol.* 3: 109-129.
- Saad, S. I.** 1962. Palynological studies in the Linaceae. *Pollen et Spores* 1: 65-82.
- Schewe, L. C., V. K. Sawhney & A. R. Davis.** 2011. Ontogeny of floral organs in flax (*Linum usitatissimum*; Linaceae) *Amer. J. Bot.* 98: 1077-1085.
- Souèges R.** 1937. Développement de l'embryon chez le *Radiola linoides* Roth. *Bull. Soc. Bot. France* 84: 297-306.
- Xavier, K. S., R. A. & C. M. Rogers.** 1980. POLLEN MORPHOLOGY OF *LINUM*, SECT. *LINASTRUM* (LINACEAE). *GRANA* 3: 183-188.
- Zuloaga, F. O., O. Morrone & J. M. Belgrano.** 2008. Linaceae. En Zuloaga F. O., Morrone, O. and Belgrano, M.J. (Eds.), Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur. *Monogr. Syst. Bot. Missouri. Bot. Gard.* 107: 2410- 2413 pp.