ESTUDIO DEL POLEN DE *PHASEOLUS CHIAPASANUS* PIPER* (LEGUMINOSAE: PHASEOLINAE)

ALFONSO DELGADO SALINAS**

ENRIQUE MARTINEZ HERNANDEZ*** y

PILAR FERNANDEZ ORTUÑO

RESUMEN

Dentro de la revisión taxonómica del género *Phaseolus*, se está llevando a cabo el estudio palinológico de varias de las especies del género. En este trabajo se describe el polen de *Phaseolus chiapasanus* Piper, el cual presenta atributos aún no descritos para el género; para lo cual se consideraron los recientes estudios palinológicos sobre el complejo *Phaseolus-Vigna*. El polen de *Ph. chiapasanus*, pertenece a la clase grande de granos de polen; es tricolporado, brevicolpado con un pseudo-opérculo cubriendo la endoapertura. La estructura del infratectum es del tipo granular-columelar, algunos de estos atributos del polen en estudio fueron descritos para especies de *Vigna* subgénero *Sigmoidotropis*.

Tomando en cuenta las características morfológicas, tanto vegetativas como reproductivas y las palinológicas de *Ph. chiapasanus* se abre la posibilidad de que esta especie conforme una nueva sección en *Phaseolus*. No obstante, esta decisión se tomará cuando existan más estudios sobre las especies y grupos del género.

ABSTRACT

In the course of a taxonomical revision of the genus *Phaseolus* and considering the recently important research realized in the *Phaseolus-Vigna* complex, where the palynological attributes for the genus were precised, the present paper describes the pollen of *Phaseolus chiapasanus* Piper. The large-size class pollen grains of *Ph. chiapasanus* are tricolporate, brevicolpate, pseudo-operculate; semitectate, and widely reticulate. The structure of the infratectum could be considered of the granular-

* Trabajo aceptado para su publicación en octubre de 1982.

** Becario del Programa de Formación de Personal Académico de la UNAM; dirección actual University of Texas, Department of Botany, Austin, Tx. 78712, U.S.A.

*** Instituto de Geología, Laboratorio de Palinología, UNAM. A.P. 70-296. Delegación Coyoacán 04510, México, D. F.

collumellar type. Some of the attributes found in the pollen of *Ph. chiapasanus* were not known for the genus, though such attributes are commonly found in the subgenus *Sigmoidotropis* of the genus *Vigna*. *Ph. chiapasanus* shows a series of morphological and palynological differences that open the possibility for the creation of a new section within the genus.

More detailed studies will definitely be needed to better document relationships to other species of the genus.

INTRODUCCION

Recientemente la delimitación taxonómica del género *Phaseolus* fue llevada a cabo por Verdcourt (1970), y posteriormente consolidada por Meréchal, Mascherpa y Stainier (1978), quienes concluyen un importante sistema de clasificación de los géneros del complejo *Phaseolus-Vigna*. Una contribución significativa en el esclarecimiento de las diferentes relaciones que guardan los géneros afines a *Phaseolus* y *Vigna*, han sido los estudios palinológicos realizados por Stainier en la ya mencionada obra y en otras publicaciones (Bronckers, *et al.*, 1972; Horvat y Stainier, 1979, 1980; Stainier 1974; Stainier y Horvat, 1978a, 1978b). En base a estos estudios y debido a que el primer autor investiga actualmente la revisión taxonómica del género *Phaseolus*, la presente contribución se aoca al estudio palinológico de *Phaseolus chiapasanus* Piper, comentando sobre su posición taxonómica dentro del género.

La especie *Phaseolus chiapanus* Piper ha tenido hasta este momento una historia oscura debido quizás a que fue omitida por C. V. Piper (1926) en su revisión de las Phaseolinae americanas, no obstante que él la describió en 1921 (Proc. Biol. Soc. Wash. 34:41). La razón por la cual Piper no consideró a esta especie en su estudio del género *Phaseolus* se desconoce; aunque cabe aclarar que no fue la única especie en ser olvidada. En 1941, Lundell (Contr. Univ. Mich. Herb. 6:27) publica una nota mencionando nuevas localidades donde se colectó esta especie de frijol en Chiapas; aclara también, de acuerdo con C.V. Morton, que ejemplares de *Ph. chiapasanus* habían sido designados como una nueva especie de *Mucuna* (*M. allocalyx*) por Standley (jamás publicada); y que dichos ejemplares habían sido distribuidos con tal nombre. No fue, hasta hace pocos años que *Ph. chiapasanus* comienza a ser nuevamente encontrado y colectado en bosques mesófilos de montaña en Veracruz, Oaxaca y Chiapas, entre los 600 y 2,000 m.s.n.m. Hasta la fecha sólo se ha encontrado dentro del territorio mexicano, pero cabe esperar que habite en Guatemala y otros lugares de América Central.

Antes de pasar a describir el polen de *Ph. chiapasanus*, es recomendable mencionar que esta especie cumple con cada una de las nueve características distintivas consideradas por Maréchal, *et al.* (1978) para el género *Phaseolus*, aunque fácilmente resalta de todas las especies de *Phaseolus* descritas hasta la fecha.

Phaseolus chiapasanus Piper es la única especie dentro del género que se ennegrece casi en su totalidad al secarse. Sus flores son de gran talla (3 cm.), las más grandes de *Phaseolus*. A su vez, las diferentes partes florales varían en relación a lo conocido, resaltando entre otras: el pétalo estandarte que además de presentar pubescencia en su cara interna, posee 2 prominentes callosidades en la base a ambos lados de la uña, y también por la presencia de una superficie estigmática cóncava, posiblemente única en la subtribu Phasedinae. Al igual que con la flor, el fruto es de gran tamaño (hasta 14 cm.) y con características estructurales de interés por estudiar. Las

POLEN DE *PHASEOLUS CHIAPASANUS*

semillas son circulares (hasta 1.5 cm.) y al germinar da una plántula hipogea con estípulas dobles en la base de los eófilos.

Hasta la fecha, las relaciones de esta especie en el género son inciertas.

MATERIAL Y METODO

El polen de *Phaseolus chiapanus* Piper fue acetolizado según la técnica de Erdtman (1952). En las observaciones de microscopía óptica se empleó un fotomicroscopio Zeiss, aplicando inicialmente la técnica de campo claro, la cual no facilita la distinción de los caracteres morfológicos del polen (Lámina 2, figuras 8-10), por lo cual también se usó la técnica del contraste diferencial de interferencia, lo que mejora notablemente la observación de los caracteres palinológicos (Lámina 2, figuras 6 y 7). El polen fue procesado para su estudio en microscopio electrónico de transmisión por el M en C Mario Vargas Olvera, se fijó con glutaraldehído al 3% y postfijado con tetróxido de osmio al 1%, incluyendo en Epon 812. Se obtuvieron cortes de 500 a 600 angstroms con ultramicrotomo L.K.B., y se contrastó con acetato de uranilo (Reynolds), y citrato de plomo (Venable); por último los cortes se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss M-9, usándose para los negativos Agfa Geavert y las impresiones fueron sobre papel Kodabromide F4 y F5.

Las fotografías tomadas con el AMR —microscopio de barrido JEOL-JSM-35 fueron hechas por E. Seling del Museo de Zoología comparada de la Universidad de Harvard, cubriendo el material palinológico con carbón y oro-paladio. Otras fotografías al M.E.B., (Lámina 1, figuras 3 y 4) sobre material acetolizado; fueron tomadas por Margarita Reyes del Instituto de Geología de la UNAM.

Las muestras de polen fueron tomadas del ejemplar (Delgado 877) depositado en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología, UNAM; y las laminillas se encuentran depositadas en el Museo de Paleontología del Instituto de Geología, UNAM.

DESCRIPCION DEL GRANO DE POLEN DE *PHASEOLUS CHIAPASANUS* PIPER

El conocimiento de la morfología y estructura del grano de polen de *Ph. chiapanus*, requiere de la combinación de varias clases de microscopía, ya que el método tradicional de microscopía óptica de campo claro, no permite dilucidar con claridad las características palinológicas de dichos granos.

Abertura

Grano de polen tricolporado, cuando se observa con microscopía óptica en vista polar, este grano de polen aparece como triporado, debido a que posee brevicolpos. El poro circular, con diámetro de 8 a 13 micras, corresponde a una endoapertura que se encuentra cubierta en granos no acetolizados por un pseudo-opérculo con superficie psilada a microverrugada (Lámina 1, Figura 5). La exoapertura o colpo limitado en todo su perímetro por el tectum que integra un muro más o menos continuo a su alrededor; la longitud polar del colpo varía entre 22 y 16 micras y con longitud ecuatorial de 12 a 18 micras, estas medidas en el colpo varían según el desarrollo del muro que lo delimita, el cual puede presentarse de manera muy irregular, reduciendo o agrandando el área colpal. La membrana del colpo es verrugosa a granulosa (Lá-

mina 1, Figuras 3 y 5), representando estructuralmente la reducción de la ectexina. Índice del área polar 0.78-0.80, área polar muy grande.

Ornamentación

Semitectado, ampliamente reticulado, heterobrocado con retícula de 3 hasta 14 micras que integran polígonos irregulares, delimitados por muros de uno hasta cinco micras de grosor y con una altura que va de uno hasta dos micras en la zona donde convergen varios muros. Ocasionalmente los muros se interrumpen (Lámina 1, Figura 2; Lámina 2, Figuras 6 y 9), quedando en consecuencia el retículo truncado. A grandes aumentos con el M.E.B. se observan microgránulos sobre los muros (Lámina 1, Figura 5).

Grosor de la Exina

En este grano de polen con ornamentación semitectada, existe una variación en el grosor de la exina, debido a la diferente altura de los muros. Así a nivel de los muros el grosor total de la exina varía entre 3.2 y 5 micras, en tanto que a nivel del lumen del retículo (áreas intectadas) el grosor de la exina se mantiene a 2 ± 0.4 micras, con una endexina de 1.5 micras y una ectexina de 0.5 de micra hasta de una micra; dicha variación en el grosor de la ectexina es producida por el diferente grado en el desarrollo de los elementos esculturales (gránulos, báculas, gemas) en las áreas intectadas (Lámina 2, Figura 12).

Estratificación de la Exina

El examen de la exina al microscopio electrónico de transmisión, muestra una endexina de estructura homogénea y una ectexina que no presenta capa basal.

LAMINA 1

- Figura 1. Grano de polen no acetolizado con M.E.B., en vista ecuatorial oblicua, se observa la membrana del colpo y el pseudo-opérculo. Nótese también la ornamentación verrugosa en este grano.
- Figura 2. Grano de polen no acetolizado con M.E.B., en vista polar, se observa el aspecto general del retículo, con los muros en ocasiones interrumpidos; en los ángulos del grano se encuentran las aberturas compuestas, formadas por la membrana del colpo y el pseudo-opérculo.
- Figura 3. Grano de polen acetolizado con M.E.B., en vista ecuatorial oblicua; se observa la endoapertura (poro) rodeado de la membrana del colpo, limitado a su vez por un muro continuo. Nótese también la ornamentación más bien granular a gemada en este grano acetolizado.
- Figura 4. Grano de polen acetolizado, que muestra un corte de la exina formada por una endexina compacta y una ectexina delgada, granulosa, gemada a verrugosa. M.E.B.
- Figura 5. Grano de polen no acetolizado que muestra un acercamiento de la zona de la abertura compuesta, mostrando el pseudo-opérculo con microverrugas en la superficie. Nótese también los microgranulos sobre los muros. M.E.B.

a nivel de las áreas intectadas (lumen del retículo), la ectexina es más delgada que la endexina, formada por gránulos que alternan con gemas y básculas, elementos que quedan contiguos pero libres en el lumen del retículo, en donde las partes terminales de los gránulos, gemas y básculas integran la ornamentación verrugosa que se observa en la superficie del lumen. Hacia la parte superior de los muros, la ectexina es homogénea y compacta formando el tectum que integra los muros; mientras que hacia la base de los muros la ectexina cambia a un infratectum granular-columelar. En realidad dicha estructura infratectal está distribuida en dos zonas: la zona contigua a la endexina,

LAMINA 2

- Figura 6. Grano de polen acetolizado en vista polar inclinada, observación con microscopía óptica de contraste diferencial de interferencia. Se observa el área de la abertura con restos del pseudo-opérculo en el poro; el cual está rodeado por la membrana del colpo. Nótese la variación en el grosor de los muros y en el lumen del retículo. En este tipo de microscopía se observa una superficie granulosa en el lumen del retículo.
- Figura 7. Grano de polen acetolizado en vista polar, observación con microscopía óptica de contraste diferencial de interferencia. Se observa una sección óptica del grano de polen. Observándose la variación en el grosor de la exina y la imposibilidad de la diferenciación en la estratificación de la misma, con este tipo de óptica.
- Figura 8. Grano de polen acetolizado en vista polar, observación con microscopía óptica de campo claro. Nótese la poca resolución que se obtiene con esta técnica, alcanzándose a observar solamente el grosor de la exina y los muros.
- Figura 9. Grano de polen acetolizado en vista polar, observación con microscopía óptica de campo claro, se ve en sección óptica el grosor total de la exina y se puede distinguir la variación en la altura de los muros. Nótese el poro.
- Figura 10. Grano de polen acetolizado en vista polar, observación con microscopía óptica de campo claro. Se observa una sección óptica. Nótese la poca resolución que se obtiene con esta técnica, alcanzándose a ver solamente el grosor de la exina.
- Figura 11. Corte de la exina en microscopía electrónica de transmisión. Se observa la endexina de naturaleza homogénea y la ectexina formada por gránulos, gemas, verrugas en la zona del lumen del retículo; mientras que a nivel de los muros se observa una ectexina compacta que integra el tectum y por debajo de estos gránulos y columelas, después sigue otra capa exclusivamente granulosa que está en contacto con la endexina.
- Figura 12. Corte la exina en microscopía electrónica de transmisión. Se observa la endexina de naturaleza homogénea y la ligera variación en el espesor de esta capa. La ectexina, en el área del lumen del retículo, se encuentra formada por una zona granular en contacto con la endexina y hacia el exterior presenta una región de gemas, columelas y verrugas. A nivel de los muros se ve una ectexina compacta que integra el tectum y por debajo de estos, columelas y gránulos constituyendo el infratectum columelar-granular de Stainier y Horvar, 1978b. La parte inferior del infratectum en contacto con la endexina es totalmente granular.

POLEN DE *PHASEOLUS CHIAPASANUS*

LAMINA 2

constituida por gránulos de diferentes tamaños, dispuestos en forma heterogénea; en la otra zona —más próxima al tectum de los muros— se presenta una mayor uniformidad en los gránulos, los cuales se alinean y fusionan formándose en ocasiones columelas unidas entre sí por medio de otros gránulos (Lámina 2, Figuras 11 y 12).

Tamaño y Forma

Eje polar de 46 hasta 74 micras, eje ecuatorial entre 52 y 82 micras; la proporción entre el eje polar y el ecuatorial varía de 0.83 — 0.93, lo que nos da un grano de polen oblado-esferoidal.

Asociación, Polaridad y Simetría

Eumonadas, isopolares, radiales

Hay que hacer notar que todas las mediciones sobre ornamentación y tamaño se aumentan notablemente en granos de polen acetolizados; de tal manera que todas las estimaciones máximas se llevaron a cabo sobre material acetolizado; mientras que las mediaciones mínimas de poros, lumen del retículo, eje polar y eje ecuatorial, se presentan sobre todo en material no acetolizado.

DISCUSION

De las 50 especies con las que aproximadamente cuenta el género *Phaseolus*, sólo el polen de cerca de 20 especies ha sido estudiado con diferente detalle (Taylor, 1966; Verdcourt, 1970; Bronckers, *et al.*, 1972; Stainier, 1974; Stainier y Horvat, 1978a; Maréchal, *et al.*, 1978). En general, en base a esta literatura se describe el polen de *Phaseolus* como tricolporado o triporado; con presencia o ausencia de pseudocolpo o esbozo del mismo; ornamentación lisa a finamente reticulada y con infratectum de naturaleza columelar (Stainier y Horvat, 1978a; Maréchal *et al.*, 1978). Se ha encontrado que tanto el tipo de infratectum, como la estructura en las especies del complejo *Phaseolus-Vigna* son atributos importantes que caracterizan a los grupos. Así tenemos que Stainier (en Maréchal, *et al.*, *op. cit.*) describe 4 tipos de infratectum: a) granular no orientado (varias especies de *Vigna*); b) granular orientado (*Vigna longifolia*, Harvat y Stainier, 1980); c) granular-columelar (*Vigna caracalla* Stainier y Horvat, 1978b) y d) columelar (*Phaseolus* algunas especies de *Vigna*), a su vez, Stainier y Horvat, 1978a y Maréchal, *et al.* (*op. cit.*), demuestran que las aberturas compuestas están relacionadas con la ocurrencia de un infratectum columelar y las aberturas simples con un infratectum granular. También mencionan que cuando la estructura es intermedia, entre granular y columelar, la abertura puede ser simple o compuesta. Como podemos observar en el polen de *Pb. chiapasanus* Piper (Lámina 2, Figuras 11 y 12) el infratectum es transicional de naturaleza granular-columelar, presentando una abertura compuesta tricolporada. Además aunado a este tipo de infratectum, el polen de *Pb. chiapasanus* muestra una reticulación amplia, ambos atributos jamás han sido establecidos como característicos de *Phaseolus*; pero sí se han encontrado como características palinológicas para especies de *Vigna* subgénero *Sigmoidotropis* (Stainier y Horvat, 1978b).

Por otro lado, Guinet (1981) indica que en varias tribus de las Leguminosas, y en particular en las *Phaseoleae*, el engrosamiento de la endexina se encuentra

frecuentemente asociado a una reducción del desarrollo de la ectexina (disminución o ausencia de la capa basal) y que esto guarda también relación con un cambio de abertura, de colporado a porado. En el caso de *Ph. chiapasanus*, no obstante la existencia de una gruesa endexina y una ausencia total de la capa basal, el polen es tricolporado.

Otros dos aspectos que resaltan en el grano de polen de *Ph. chiapasanus*, con respecto a las demás especies estudiadas del género, es el tamaño total del grano de polen y la presencia de pseudo-opérculo (en el sentido de Roland, 1966) cubriendo a la endoapertura. Tomando en consideración las clases referentes al tamaño de los granos de polen propuestas por Erdtman (1952), el polen de *Ph. chiapasanus* se encuentra entre los granos de polen grandes (50-99 micras). Otra vez, sobresaliendo del tamaño promedio (25-49 micras) que en general presentan los otros granos de polen del género. Por lo que respecta a la presencia de pseudo-opérculo, cabe aclarar que hasta la fecha no se ha descrito para los granos de polen de *Phaseolus*; aunque como se apunta en la descripción quizás se deba a la técnica de acetólisis usada, ya que observaciones de polen de *Ph. chiapasanus* sin el uso de dicha técnica demuestran su presencia (Lámina 1, Figuras 1, 2 y 5). Dichos pseudo-opérculos son en general psilados a ligeramente microverrugados, lo que contrasta con los opérculos glomerulados de ciertas especies de *Vigna* (Horvat y Stainier, 1980). Es claro, que el pseudo-opérculo presente en *Ph. chiapasanus* se limita sólo a la endoapertura (poro), característica poco común en la tribu *Phaseoleae* (Ferguson y Skvarla, 1981).

CONCLUSIONES

Como podemos observar el polen de *Ph. chiapasanus* Piper resalta por un buen número de atributos que quizás con el tiempo puedan ser sopesados taxonómicamente en forma diferente. Consideramos que hasta el momento aún no podemos ofrecer una visión evolutiva del polen del género, ya que como nos indica este estudio, existe la necesidad de un análisis comparativo más completo de las especies del género. Sin embargo, tomando en cuenta las tendencias evolutivas ya descritas por Maréchal, *et al.*, (op. cit.) para el complejo *Phaseolus-Vigna* y en general, por Walker (1975), se podría considerar al polen de *Ph. chiapasanus* como menos evolucionado en comparación a lo descrito para las otras especies de *Phaseolus*, por presentar un infratectum granular-columelar y por el desarrollo de un semitectum con amplio retículo.

Hasta la fecha, las diferencias encontradas en este estudio en el polen de *Phaseolus chiapasanus*, aunadas a las notables diferencias en cuanto a la morfología floral, abren la posibilidad de un nuevo status de esta especie dentro del género, quizás representante de una nueva sección.

BIBLIOGRAFIA

- BRONCKERS, F., B. DE KEYSER, y F. STAINIER. 1972, Contributions a l'étude palynologique des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. II.—Etude des genres *Haydonia* R. Wilczek, *Phaseolus* L., *Vigna* Savi et *Voandzeia* Thouars au Zaïre. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 42: 251-267. 6 fotos.
- ERDTMAN, G. 1952, *Pollen morphology and plant taxonomy. I. Angiosperms.* Waltham, Mass. Chronica Botanica, 539 p.
- , 1952, *Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms (An introduction to palynology I: Almquist & Wiksell. XII. Stockholm. 539 p.*

- FERGUSON, I. K. y J. J. SKVARLA. 1981, The pollen morphology of the subfamily Papilionoidae (Leguminosae). p. 859-896. En: R. M. Polhill y P. H. Raven (Eds.) **Advances in Legumes Systematics 2**. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- GUINET, Ph. 1981, Comparative Account of pollen characters in the Leguminosae. p. 789-799. En: R. M. Polhill y P. H. Raven (Eds.) **Advances in Legumes Systematics 2**. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- HORVAT, F. y F. STAINIER, 1979, L'étude de l'exine dans la complexe *Phaseolus-Vigna* et dans des genres apparentés. III. **Pollen et Spores, Paris. 21** (1-2): 17-30.
- , 1980, L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans des genres apparentés IV. **Pollen et Spores, Paris. 22** (2): 139-172.
- MARECHAL, R., J. M., MASCHERPA y STAINIER, F. 1978, Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base des données morphologique et pollinique, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera 28**: 1-273.
- PIPER, C. V. 1926, Studies in American Phaseolinae. **Contr. U. S. Nat. Herb. 22**: 663-701.
- ROLAND, F. 1966, Etude de l'ultrastructure des apertures: pollens a pores. **Pollen et Spores, Paris. 8** (3): 409-419.
- STAINIER, F. 1974, Contribution a l'étude Palynologique des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae III. Etude de quelques espèces de genres *Phaseolus* L., *Vigna* Savi et *Physostigma* Balf. **Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 44**: 1-15.
- STAINIER, F. y F. HORVAT, 1978a. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans de genres apparentés, I. **Pollen et Spores, Paris. 20** (2): 195-214.
- , 1978b. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et des genres apparentés. II **Pollen et Spores, Paris. 20** (3): 341-349.
- TAYLOR, A. S. 1966, Estudios sobre polen de *Phaseolus*. **Turrialba 16**: 7-14.
- VERDCOURT, B., 1970, Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the Flora of Tropical East Africa IV. **Kew Bull. 24**: 507-569.
- WALKER, I. y J. J. SKVARLA, 1975, Primitively columellaless pollen: A new concept in the evolutionary morphology of Angiosperms. **Science 187**: 445-447.