Anatomía de la semilla de cuatro especies mexicanas de *Hippocratea* (Celastraceae)

MA. GUADALUPE ESPINOSA-OSORNIO y E. MARK ENGLEMAN¹

RESUMEN. Se estudió la morfología y, mediante microscopía fotónica, la anatomía de semillas maduras de *H. acapulcensis*, *H. celastroides*, *H. excelsa* y *H. volubilis*. En las cuatro especies las semillas son aladas y el ala es mas grande que el cuerpo que contiene el embrión. El ala puede ser membranosa o casi toda engrosada por la abundancia de células traqueoidales isodiamétricas. El haz vascular de la rafe recorre el ala longitudinalmente en la parte media; además un haz de células traqueoidales alargadas recorre por uno de los bordes del ala, o cerca de éste. El ala tiene también zonas engrosadas por la abundancia de células traqueoidales isodiamétricas de paredes gruesas. El embrión es grande con un eje pequeño. Los cotiledones son connados y pueden o no conservar la epidermis en la superficie adaxial, pero una cutícula sólo se observó en la superficie abaxial. La cubierta seminal se forma de exotesta con taninos, mesotesta de células traqueoidales alargadas y endotegmen taninífero. Hay dos cutículas gruesas, la externa y la nucelar. Hay de uno a cuatro estratos de endospermo.

ABSTRACT. The morphology and anatomy of mature seeds of *H. acapulcensis*, *H. celastroides*, *H. excelsa* y *H. volubilis* were studied by light microscopy. In all four species the seeds are winged and the wing is larger than the body that contains the embryo. The wing may be mostly membranous or mostly thickened by the abundance of isodiametric tracheoidal cells. The vascular bundle of the raphe passes longitudinally through the middle of the wing. Additionally, a bundle of elongate tracheoidal cells passes along one edge of the wing or close by it. The wing has zones thickened by an abundance of thick-walled isodiametric tracheoidal cells. The embryo is large with a short axis. The cotyledons are connate and may or may not maintain the epidermis of the adaxial surface, but cuticle was observed only on the abaxial surface. The seed coat is formed by an exotesta with tannins, a mesotesta of elongate tracheoidal cells and a tanniniferous endotegmen. There are two thick cuticles, one on the exotesta and one on the nucellus. There are from one to four layers of endosperm.

¹ Centro de Botánica, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillo, Edo. de México.

El género *Hippocratea* cuenta con 100 especies, y diez de ellas se encuentran en México: *H. acapulcensis*, *H. acutifolia*, *H. celastroides*, *H. chiapanensis*, *H. elliptica*, *H. excelsa*, *H. rovirosae*, *H. uniflora*, *H. utilis* y *H. volubilis*. Estas se distribuyen en la costa del Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas, en la costa del Golfo desde Tamaulipas hasta Yucatán, y en Durango, Morelos, Puebla y Edo. de México (Standley, 1923; Palacios *et al.*, 1989).

Algunas especies de *Hippocratea* poseen metabolitos secundarios que confieren propiedades terapéuticas e insecticidas. *Hippocratea* sp. permite un buen combate del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Coleoptera: Curculionidae) y del barrenador mayor de los granos (*Phostephanus truncatus* Coleoptera: Bostrichidae) en maíz almacenado (Páez, 1987). *H. excelsa*, conocida como "cancerina", tiene efecto insecticida sobre plagas como *S. zeamais*, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *T. confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Rhizopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), *Cryptolestes* sp. (Coleoptera: Cucujidae) y *Gnathocerus maxillosos* (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz almacenado (Torres, 1989). *H. acapulcensis* e *H. celastroides* son conocidas en algunos lugares de Guerrero, Michoacán y Oaxaca como "semilla del piojo" o "mata piojo", debido a sus propiedades insecticidas (Standley, 1923). Además, la cancerina se ha utilizado desde tiempos remotos en comunidades indígenas como planta medicinal, para ciertos padecimientos de la piel, úlceras gástricas y enfermedades del riñón (Palacios *et al.*, 1989; Mata *et al.*, 1990).

El estudio de la embriología de *Hippocratea* se restringe a seis especies: *H. cinerascens*, *H. clematioides* y *H. grisebachii* (Mauritzon, 1936), *H. indica* (David, 1938), *H. grahamii* (Adatia y Gavde, 1962; Johri, 1963) y *H. celastroides* (Espinosa-Osornio y Engleman, 1994); solo ésta última se distribuye en México. Adatia y Gavde (1962), con base en el estudio embriológico de *H. grahamii*, apoyan la separación del género en una familia aparte, la Hippocrateaceae. Al estudiar *H. celastroides*, nos dimos cuenta de que hay variabilidad en algunas características embriológicas del género; los óvulos pueden ser tenuinucelados o crasinucelados y el micrópilo puede estar formado por uno o dos tegumentos. Las seis especies estudiadas presentan características comunes como: a) óvulos anátropos, bitégmicos y con un tapete tegumentario; b) el desarrollo del saco embrionario de tipo Polygonum; y c) el desarrollo del endospermo de tipo nuclear (Davis, 1966).

Sin embargo, poco se indica sobre las características de las semillas maduras. Adatia y Gavde (1962) mencionan que la cubierta seminal madura se forma del tegumento externo y del estrato más interno del tegumento interno. Corner (1976) sólo menciona que las semillas son exariladas y exalbuminosas. Hutchinson (1979) y Cronquist (1981) mencionan que las semillas son aladas, con una radícula diminuta, exalbuminosas y frecuentemente con los cotiledones connados. Espinosa-Osornio y Engleman (1993) describen detalladamente la cubierta seminal madura de

H. celastroides. En este trabajo se plantea el estudio morfológico y anatómico de la semilla madura de cuatro especies de *Hippocratea* que se distribuyen en México, para ampliar el conocimiento sobre el género y para determinar si las características de la semilla madura presentan variabilidad intragenérica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron semillas maduras de *H. acapulcensis* H.B.K. donadas por los herbarios MEXU y ENCEB, *H. celastroides* H.B.K. colectadas por los autores en el Estado de Morelos, *H. excelsa* H.B.K. donadas por el herbario MEXU y *H. volubilis* L. donadas por el herbario ENCEB (cuadro 1). A las semillas se les revisó primero su morfología externa; posteriormente se incluyeron en parafina para revisar su anatomía mediante microscopía fotónica. Se realizaron cortes de 10 micrómetros (μm) en un microtomo rotatorio. Se tiñeron con safranina-verde fijo, rojo O de aceite y azul de toluidina-cloruro de calcio (Herr, 1992).

CUADRO 1. Fechas y localidades de colecta de las semillas de *Hippocratea* spp.

ESPECIE	HERBARIO	COLECTOR	REGISTRO	FECHA DE COLECTA	LUGAR DE COLECTA
<i>H. acapulcensis</i>	MEXU	M. Quintani Ila	S/N	abril 1981	Pico de Oro, Chis.
	ENCEB	----	----	marzo 1981	Jojutla Mor.
<i>H. celastroides</i>	CHAPA	Espinosa-Osornio y Engleman	S/N	marzo 1991	Tequesquitengo, Mor.
<i>H. excelsa</i>	MEXU	E. Matuda	31223	julio 1922	San Antonio Tlataya, Edo. de México
<i>H. volubilis</i>	ENCEB	----	----	marzo 1972	Ocozocuatla de Espinosa

RESULTADOS

Morfología externa. Las semillas de las cuatro especies son aladas. La semilla de *H. celastroides* mide 42 mm, la de *H. acapulcensis* 36 mm, *H. excelsa* 35 mm y *H. volubilis* alcanza sólo unos 29 mm. En todos los casos el ala es mayor que el cuerpo que contiene el embrión (fig. 1). En las cuatro especies, el haz vascular de la rafe recorre longitudinalmente la parte media del ala. En *H. acapulcensis* y *H. celastroides* el ala es membranosa y en el borde ventral tiene un haz de células traqueoidales. En las cuatro especies el ala tiene amplias zonas engrosadas debido a la presencia de muchas células traqueoidales. La forma y tamaño de estas zonas varían dependiendo de la especie. En *H. acapulcensis* es apenas una línea en el borde dorsal. En *H. celastroides* es una zona pequeña en el borde dorsal. En *H. volubilis* ocupa casi el 50% de la superficie del ala y se encuentra a ambos lados del haz vascular de la rafe. En *H. excelsa* esta zona es aún más extensa; ocupa casi el 100% de la superficie entre el haz vascular de la rafe y el haz de células traqueoidales, y casi el 50% de la superficie de la otra mitad del ala. El ángulo que la cubierta forma en la cercanía del micrópilo es poco menor de 90° en *H. acapulcensis* y *H. celastroides*, es mayor a 90° en *H. volubilis* y es de casi 180° en *H. excelsa*.

Fig. 1. Semillas de cuatro especies de *Hippocratea*. a) *H. acapulcensis*. b) *H. celastroides*. c) *H. excelsa*. d) *H. volubilis*. T= zona engrosada con células traqueoidales; HT= haz de células traqueoidales; HR= haz vascular de la rafe; H= hilo; M= zona del micrópilo.

CUADRO 2. Longitud del embrión y eje embrionario en *Hippocratea* spp. (promedios de 3-10 mediciones).

ESPECIE	EMBRIÓN (mm)	EJE EMBRIONARIO (mm)	PROPORCIÓN EJE-EMBRIÓN
<i>H. acapulcensis</i>	15.5	1.3	0.084
<i>H. celastroides</i>	18.4	1.0	0.054
<i>H. excelsa</i>	13.1	1.0	0.076
<i>H. volubilis</i>	10.8	0.9	0.083

Anatomía del embrión. El embrión es grande, con un eje pequeño (cuadro 2). Ocupa el 8.4% del total de la longitud del embrión en *H. acapulcensis*, 7.6% en *H. excelsa* y 8.3% en *H. volubilis*. *H. celastroides* es la especie que proporcionalmente tiene el eje embrionario mas pequeño; ocupa sólo el 5.4% del embrión. Los cotiledones son connados. En *H. acapulcensis* y *H. celastroides* no hay epidermis intercotiledonar; la epidermis se recorre sólo dos o tres células entre los bordes de los cotiledones, pero la cutícula del lado abaxial no entra en la zona de contacto de los lados adaxiales (figs. 2a y 2b). *H. volubilis* sí conserva las epidermis intercotiledonares, pero la cutícula sólo cubre las primeras tres o cuatro células periféricas de la unión (fig. 2d), mientras que en *H. excelsa* hay epidermis intercotiledonar y una delgada cutícula cubre las primeras 12-15 células de la epidermis intercotiledonar (fig. 2c). La epidermis de la superficie abaxial de los cotiledones, en todos los casos se halla cubierta por una delgada cutícula (línea gruesa en la fig. 2). En las cuatro especies se observaron en los cotiledones drusas con un tamaño máximo de 16 μm . En *H. volubilis* los cotiledones desarrollaron abundantes espacios intercelulares, al parecer esquizógenos. En *H. excelsa* existen espacios similares pero en menor cantidad, mientras que en *H. acapulcensis* e *H. celastroides* los cotiledones son compactos.

Cubierta seminal. La cubierta seminal en las cuatro especies se forma por la exotesta, la mesotesta y el endotegmen. Las cutículas que se observaron fueron la externa y la nucelar. En todos los casos la cutícula externa es más gruesa que la nucelar, pero ambas son bastante más gruesas que la cutícula cotiledonar. En *H. celastroides* se observó algunas veces una delgada cutícula intertegumentaria. El grosor de la cubierta varía con la especie (cuadro 3). La exotesta es taninífera; sólo en *H. acapulcensis* la exotesta tiene pocos taninos. La mesotesta tiene células traqueoidales. El endotegmen es taninífero, pero en *H. excelsa* los taninos son poco evidentes (fig. 3). La forma de las células traqueoidales de la cubierta es siempre alargada, pero varía

CUADRO 3. Grososres de la cubierta de *Hippocratea* spp. en micrómetros (promedios de 15 mediciones).

ESPECIE	CUBIERTA	EXOTESTA	MESOTESTA	ENDOTEGMEN
<i>H. acapulcensis</i>	151	21	125	5
<i>H. celastroides</i>	164	35	120	9
<i>H. excelsa</i>	116	49	64	3
<i>H. volubilis</i>	120	28	77	15

el grosor y la forma de los engrosamientos de la pared lignificada. En *H. acapulcensis* la pared de las células traqueoidales se tiñe fuertemente con safranina y con azul de toluidina-cloruro de calcio; la mayor parte de la pared está lignificada y presenta puntuaciones. En *H. celastroides* la pared de las células traqueoidales puede tener puntuaciones o engrosamientos reticulados o escalariformes, pero en los tres casos la pared se tiñe fuertemente con safranina y azul de toluidina-cloruro de calcio. En *H. excelsa* la tinción con safranina no es fuerte en toda la cubierta; los estratos subyacentes a la exotesta se tiñen más que los estratos más internos, en parte por que las paredes son más gruesas en la periferia. Con azul de toluidina-cloruro de calcio la tinción es

Fig. 2. Corte transversal del embrión al nivel de los cotiledones, mostrando cutícula y epidermis. a) *H. acapulcensis*; b) *H. celastroides*; c) *H. excelsa*; d) *H. volubilis*. e= epidermis cotiledonar abaxial; ei= epidermis intercotiledonar, Cc= cutícula cotiledonar, Ci= cutícula intercotiledonar.

Fig. 3. Cubierta seminal. a) *H. acapulcensis*; b) *H. celastroides*; c) *H. excelsa*; d) *H. volubilis*. Ex= exotesta; M= mesotesta; en= endotegmen; CE= cutícula externa; CN= cutícula nucelar, CI= cutícula intertegumentaria. La barra equivale a 50 μm .

intensa en los estratos periféricos, pero la región interna de la mesotesta no se tiñe, lo cual indica que sus paredes no están lignificadas. Los engrosamientos son reticulados y escalariformes, pero muchas células son colapsadas. En *H. volubilis* las células traqueoidales tiñen fuertemente con safranina y con azul de toluidina. Las paredes son gruesas con engrosamientos reticulados. El grosor de las paredes va de mayor a menor en *H. acapulcensis*, *H. celastroides*, *H. volubilis* y *H. excelsa*.

Endospermo. Debajo de la cubierta seminal, se encontraron de uno a cuatro estratos de endospermo (cuadro 4).

CUADRO 4. Endospermo en *Hippocratea* spp.

Especies	Número de estratos	Grosor (μm) (promedio de 15 mediciones)
<i>H. acapulcensis</i>	1-3	28
<i>H. celastroides</i>	2-3	20
<i>H. excelsa</i>	2-3	42
<i>H. volubilis</i>	3-4	40

Fig 4. Células traqueoidales en *H. celastroides*. a) ala; b) cubierta.

Ala. En cortes transversales se pudo observar que el ala está cubierta de una epidermis como la de la cubierta del cuerpo de la semilla. EL interior del ala está compuesto de: a) células de pared delgada sin engrosamientos y b) células de pared engrosada y lignificada (células traqueoidales). Las células traqueoidales del ala difieren de las de la cubierta seminal en que son casi isodiamétricas, tienen pocas puntuaciones y pueden presentar espacios intercelulares grandes (fig. 4). En las cuatro especies el haz vascular de la rafe es el único y atraviesa la parte media del ala. En la figura 5 se muestran cortes transversales del ala al nivel medio de la semilla completa.

En *H. acapulcensis* y *H. celastroides* casi toda el ala es membranosa, la zona engrosada es pequeña; la parte membranosa del ala es más gruesa en la zona entre la rafe y el haz de células traqueoidales que del otro lado de la rafe, y mide de 59 a 97 μm . En el borde dorsal se encuentra la pequeña zona engrosada de células traqueoidales en donde el grosor del ala alcanza hasta 208 μm . La parte membranosa del ala puede o no tener células con paredes lignificadas. En ocasiones las células epidérmicas y subepidérmicas tienen paredes lignificadas y las células más internas conservan sus paredes delgadas. El haz de células traqueoidales se ubica en el borde ventral del ala y tiene de 277 a 515 μm de grosor. En *H. excelsa* las células de los dos o tres estratos subepidérmicos tienen paredes lignificadas y las células más internas conservan sus paredes delgadas. En *H. volubilis* las células tienen paredes lignificadas, pero una pequeña parte del ala, las células más internas en corte transversal, sobre todo entre el haz vascular y el haz de células traqueoidales conservan sus paredes delgadas.

En *H. excelsa* y *H. volubilis* la mayor parte del ala es engrosada, alcanzando de 762 a 1079 μm de grosor en la zona del haz vascular de la rafe. El haz de células traqueoidales no se encuentra hasta la orilla del ala y sus células tienen la paredes mas gruesas que las células traqueoidales que las rodean. Este haz no es vascular porque las células no se ordenan en tubos, ni hay presencia de floema.

DISCUSIÓN

De acuerdo con Adatia y Gavde (1962), la cubierta de la semilla madura se forma de tegumento externo (exotesta y mesotesta) y el estrato más interno del tegumento interno (endotegmen). Nosotros observamos además que la exotesta y el endotegmen presentan taninos, aunque su concentración varía entre especies, y que la mesotesta está siempre formada por células traqueoidales. La mesotesta forma la mayor parte del grosor de la cubierta, del 57 al 83% en las cuatro especies.

En *H. excelsa* es posible que las semillas utilizadas hayan sido colectadas antes de su madurez, puesto que fueron colectadas en el mes de julio en San Antonio Tlataya, Edo. de México. Sabemos que *H. celastroides* se madura en febrero y marzo y que el último proceso en la maduración de la semilla es la lignificación de las paredes de la mesotesta, lo cual ocurre primero en las células externas. En las semillas examinadas de *H. excelsa* las células internas de la mesotesta no están lignificadas, tal vez por falta de madurez.

Fig. 5. Cortes transversales de ala, al nivel medio de la semilla completa. a) *H. acapulcensis*; b) *H. celastroides*; c) *H. excelsa*; d) *H. volubilis*. HR = haz vascular de la rafe; HT = haz de células traqueoidales.

Con respecto al endospermo, Corner (1976), Hutchinson (1979) y Cronquist (1981) mencionan que no hay endospermo, pero aquí se encontró que siempre hay una cantidad pequeña de endospermo presente. En lo que se refiere al ala, aquí se observó que tanto la parte membranosa como la engrosada pueden estar constituidas por células de pared delgada o por células traqueoidales.

El eje del embrión es pequeño, tal y como lo mencionan Hutchinson (1979) y Cronquist (1981). Estos mismos autores mencionan que en el género *Hippocratea* los cotiledones frecuentemente se encuentran connados, pero no mencionan la condición anatómica. Aquí se encontró que las epidermis de la zona connada pueden estar presentes, como en *H. excelsa* y *H. volubilis* o ausente como en *H. acapulcensis* y *H. celastroides*, pero no se encontró cutícula en dicha zona.

LITERATURA CITADA

- ADATIA, R.D. y S.G. GAVDE. 1962. Embryology of Celastraceae. **En:** Council of Scientific and Industrial Research. Plant embryology. A symposium. New Delhi, India. pp. 1-11.
- CORNER, E.J.H. 1976. The seeds of dicotyledons. Cambridge University Press, London. 2 v.
- CRONQUIST, A. 1981. A integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York.
- DAVID, E. 1938. Embryologische Untersuchungen an Myoporaceen, Salvadoraceen, Sapindaceen und Hippocrateaceen. *Planta* 28:680-703.
- DAVIS, G. L. 1966. Systematic embryology of the angiosperms. Wiley, New York. 528p.
- ESPINOSA-OSORNIO, M.G. y E.M. ENGLEMAN. 1993. Anatomía del desarrollo de la semilla de *Hippocratea celastroides* H.B.K. *Bol. Soc. Bot. México* 53: 43-53.
- HERR, J.M. 1992. New uses for calcium chloride solution as mounting medium. *Biotech. and Histochem.* 67(1):9-13.
- HUTCHINSON, J. 1979. The families of flowering plants. Arranged according to a new system based on their phylogeny. Otto Koeltz Science Publishers, Germany. 968p.
- JOHRI, B.M. 1963. Embryology and Taxonomy. **En:** P. Maheswari (Ed.). Recent advances in the embryology of angiosperms. Catholic Press. New Delhi. pp. 396-444.
- MATA, R., F. CALZADA, E. DÍAZ y R.A. TOSCANO. 1990. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. XV. Sesquiterpene evoniotate alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.* 53(5):1212-1219.
- MAURITZON, J. 1936. Embryologische Angaben über Stackousiaceae, Hippocrateaceae und Icacinaceae. *Svensk. Bot. Tidskr.* 30:541-550.
- PALACIOS, J., R. MATA, R. LÓPEZ, E. LINARES, y R. BYE. 1989. *Hippocratea excelsa* (Hippocrateaceae) a new source of transisoprene. *Econ. Bot.* 43(4):508-509.

- PÁEZ L., A. 1987. El uso de polvos vegetales e inertes minerales como una alternativa para el control del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) en maíz almacenado. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 120p.
- STANDLEY, P.C. 1923. 83. Celastraceae. Bittersweet family. En: Trees and shrubs of Mexico. Contr. U. St. Natl. Herbr. 23(Part 3):676-685.
- TORRES R., J.C., 1989. Actividad de cuatro polvos minerales de *Hippocratea excelsa* en el combate de insectos plaga en maíz almacenado en Cárdenas, Tabasco. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 88p.