DESARROLLO DEL GAMETOFITO FEMENINO DE *TAGETES PATULA* (ASTERACEAE)

MARCELINA GARCIA-AGUILAR, E. MARK ENGLEMAN Y EULOGIO PIMIENTA-BARRIOS

Especialidad de Botánica, Instituto de Recursos Naturales, IRENAT.
Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. e-mail: mgarcia@cgiar.org

Resumen. La forma común de reproducción en el género *Tagetes* es sexual, a través de semilla. Sin embargo, recientes estudios morfológicos y de hibridación realizados en la especie *Tagetes patula* L. sugieren la presencia de apomixis (formación de semillas sin fecundación). Con la finalidad de esclarecer el origen sexual o apomítico del embrión, el presente estudio describe la megasporogénesis, megagametogénesis y desarrollo temprano del embrión. *Tagetes patula* L. tiene el óvulo típico de la familia Asteraceae: anátropo, unitégmico, tenuinucelado y de placentación basal. Una célula arqueesporial hipodermal se desarrolla directamente como la célula madre de la megaspóra. La megasporogénesis es normal (división meiótica, con formación de tétrade) y el saco embrional se desarrolla de la megaspóra calazal. El saco embrional es de tipo *Polygonum*. Las flores femeninas (radiales) muestran irregularidades del megagametofito como: formación de más de ocho núcleos, polaridad invertida, y diferenciación incompleta de células del megagametofito en flores maduras. Tales irregularidades no representan una evidencia contundente de la reproducción apomítica.

Palabras clave: *Tagetes*, saco embrional, embriología, óvulo, Asteraceae.

Abstract. The genus *Tagetes* reproduces sexually by seed, but recent morphological and hybridization studies in *Tagetes patula* suggest an apomictic type of reproduction (seed development without fertilization). In order to determine the sexual or apomictic origin of the embryo, we have studied megasporogenesis, megagametogenesis and the early development of the embryo. *Tagetes patula* L. has a typical ovule for the family Asteraceae: anatropous, unitegmic, tenuinucellate and with basal placentation. A single hypodermal archesporial cell develops directly as the megaspore mother cell. Megaspogogenesis is normal and embryo sac develops from the chalazal megaspore. The embryo sac is of the *Polygonum* type. Female ray flowers show irregularities in megagametophyte development such as formation of more than eight nuclei, inverted polarity and incomplete differentiation of the megagametophyte cells in mature flowers. These irregularities do not necessarily prove apomictic reproduction in *Tagetes patula*.

Key Words: *Tagetes*, embryo sac, embryology, ovule, Asteraceae.

Los estudios embriológicos realizados en la familia Asteraceae incluían, hasta 1967, únicamente el 15% de sus géneros, en los que se registra una gran variabilidad en la formación del saco embrional (Davis, 1967), así como una gran tendencia hacia la reproducción apomítica (Asker, 1984).

El género *Tagetes* incluye 50 o más especies silvestres y cultivadas cuyas características morfológicas y químicas han sido ligadas a diversos usos como: ornamental, medicinal y religioso. *Tagetes* ha sido motivo de estudios químicos, morfológicos y citológicos; en estos últimos se menciona que la poliploidía es un hecho

frecuente (Solbrig, 1977). La forma más común de reproducción en *Tagetes* es por vía sexual, y se considera que pocos híbridos naturales entre los diferentes niveles de ploidía de las especies de Tageteae están asociadas a la apomixis. No obstante el alto asentamiento de semillas en plantas triploides y tetraploides que presentan meiosis irregular y baja viabilidad de polen, sugiere la presencia de apomixis en algunos géneros de la familia Asteraceae (Strother, 1977).

Recientes estudios morfológicos y de hibridación en el género *Tagetes* (M.A. Serrato, comunicación personal) sugieren la presencia de apomixis, sin

embargo, la carencia de observaciones embriológicas que indiquen evidencias claras de este fenómeno, limita la confiabilidad de los resultados obtenidos. Con la finalidad de esclarecer el origen sexual o apomítico del embrión, se realizó un estudio anatómico de la megasporogénesis, megagametogénesis, embriogénesis y algunos aspectos generales del óvulo en la especie tetraploide *Tagetes patula* L. (Neher, 1966; Chen y Lin, 1982; M.A. Serrato-Cruz, comunicación personal).

Materiales y métodos

A partir de semillas se establecieron plantas de *Tagetes patula* encontradas en San Miguel Coatlinchán, Estado de México. Para este estudio, las plantas permanecieron bajo condiciones de invernadero hasta la floración.

Se recolectaron ovarios de flores hermafroditas y femeninas con polinización libre en diferentes estadios de desarrollo (antes y después de polinización). Los ovarios se fijaron en FAA (formalina 10%: ácido acético 5%: alcohol 52%: agua 33%) se infiltraron en parafina y se tiñeron con safranina-verde fijo (Johansen, 1940).

Resultados

Megasporogénesis, Megagametogénesis y Embriogénesis Normales: el óvulo maduro es anátropo, y tienen forma ovalada visto en sección transversal. El haz vascular penetra a través del funículo, rodea el óvulo completamente y termina en el ápice del único tegumento por el lado de la antirrafe.

La nucela está constituida por una epidermis uniestratificada que rodea el tejido esporógeno. Una, u ocasionalmente dos o más, de las células del tejido esporógeno, situada en el estrato subepidérmico, se diferencia como el megasporocito, distinguible por su tamaño mayor y por la intensa afinidad de su núcleo a la safranina. No hay células parietales; la condición es tenuinucelada. Posteriormente, el megasporocito entra en meiosis y origina cuatro megasporas con acomodo linear (figura 1).

La megaspora calazal funciona como la célula madre del saco embrional y su desarrollo incluye incremento en tamaño y el colapso de las otras megasporas y células nucleares (figura 2). La megaspora funcional se divide mitóticamente para formar el estadio binucleado (figura 3) y tetranucleado (figura 4) del saco embrional. No se observó la tercera división mitótica, pero se organiza un saco embrional maduro de siete núcleos y seis células con arreglo del tipo *Polygonum* (figura 5).

Durante el desarrollo del megagametofito, las células de epidermis nucelar se desintegran (figura 3). En este período se forma la capa endotelial de la epidermis interna del tegumento. Estas células se alargan en dirección perpendicular a la superficie del óvulo, lo que les confiere una apariencia rectangular, y adquieren una fuerte afinidad a la safranina. Los núcleos frecuentemente contienen más de dos nucléolos. En etapas iniciales, el endotelio es uniestratificado pero en estadio de gametofito maduro el endotelio se pluriestratifica, principalmente en los extremos calazal y micropilar.

El saco embrional maduro está constituido por dos células sinérgidas, una ovocélula, la célula central binucleada y dos células antípodas en arreglo linear (de escalera) (figura 5). Cada célula sinérgida presenta forma triangular, citoplasma denso, un núcleo pequeño hacia el extremo micropilar y una vacuola hacia la zona calazal; en tanto que la ovocélula presenta forma de pera, citoplasma denso y una vacuola micropilar que se hace más visible al momento de la fecundación.

Regularmente se forman dos células antípodas desiguales con arreglo linear, la más cercana a la célula central forma una vacuola grande en dirección al micrópilo, y su núcleo es calazal trinucleolado. La antípoda calazal es más pequeña, de citoplasma denso, sin vacuola y con varios nucléolos en el núcleo. La célula central está bien delimitada de las antípodas; el núcleo del extremo calazal migra hacia el micrópilo y se fusiona con el otro núcleo polar antes de la fecundación.

La fertilización del óvulo es porogámica en 60% de las flores femeninas, pero en las flores hermafroditas no se observaron tubos polínicos en el micrópilo. En las flores femeninas, el tubo polínico descarga los núcleos espermáticos en una de las células sinérgidas, destruyéndola, en tanto que la sinérgida restante permanece íntegra por más tiempo en la base del micrópilo.

El desarrollo del endospermo es del tipo celular y su formación se inicia antes que el cigoto, por lo que cuando éste presenta sus primeras divisiones se encuentra rodeado por varias células endospermicas. Las células antípodas persisten durante el estadio globular del embrión y degeneran en el estadio de corazón. El tamaño del saco embrional aumenta, provocando un adelgazamiento de las células del endotelio y la obliteración de algunas de ellas. De esta manera, el endotelio vuelve a ser uniestratificado como en su origen, pero las células que lo constituyen son muy delgadas y poco visibles en el estadio de corazón del embrión. Sólo se encontró el desarrollo de un embrión por óvulo en ambos tipos de flores (figura 6).

Figuras 1-4. Figura 1 flor hermafrodita. Figuras 2-4 flor femenina. 1. Tenuinucela mostrando la tétrade de megasporas rodeadas por un estrato de células nucelares. Dos megasporas micropilares presentan núcleo y nucleólo conspicuos. La epidermis interna (CE) del tegumento se observa bien definida por un estrato de células alargadas perpendicularmente. 857x. 2. Megaspóra funcional (MF) y megasporas micropilares no funcionales en diferentes grados de degeneración 1128x. 3. Estadio binucleado del saco embrional, degeneración de la epidermis nucelar, y endotelio diferenciado (ET) 1018x. 4. Estadio tetranucleado del saco embrional y endotelio 843x.

Anormalidades en el megasporangio y en el desarrollo del megagametofito: en algunas muestras se observaron alteraciones morfológicas como la formación de dos óvulos unidos a un mismo funículo (figura 7) y diferentes grados de fusión (aparentemente congénita) entre dos óvulos. Las irregularidades se observaron en muchas flores femeninas, pero no en flores hermafroditas. Ocasionalmente se observaron modificaciones en el saco embrional maduro como arreglo de tres células antípodas en vez de dos, arreglo de antípodas en forma de abanico, sinérgidas poco diferenciadas, ausencia de ovocélula, ausencia de antípodas y ausencia de célula central.

En algunas muestras se observaron células de la cálaza con varios núcleos libres esparcidos al azar en el citoplasma. Se presume que estas células se originaron sin reducción meiótica ya que no se observó la formación de tétrade.

En los casos en que se encontraban dos óvulos completamente desarrollados unidos a un mismo funículo, y en óvulos con una fusión parcial, se distinguió claramente la cubierta endotelial uniseriada para cada caso de formación de saco embrional (figura 7). Fue también notorio que los sacos embrionales de cada óvulo se encontraban en diferentes estadios de desarrollo. Se observó dentro de un mismo lóculo, un óvulo en etapa de núcleos libres y otro óvulo en etapa de saco embrional maduro o con formación temprana de embrión (figura 7).

Discusión

Las características del óvulo de *Tagetes patula* concuerdan con las descritas por Misra (1957), Davis (1962 a, b), Swarajya *et al.* (1986) y Swarajya y Pullaiah (1989) en sus estudios de varias compuestas, en los que consiguan que los óvulos son anátropos, unitégmicos y tenuinucelados con un solo haz vascular que penetra por el funículo, rodeando la cálaza hasta la antirrafe.

A veces se encontraron dos nucelas envueltas por un solo tegumento, pero no se encontró evidencia de que dos tegumentos se levantan separados y después se fusionaran. Esto probablemente porque los óvulos presentan fusión congénita. Péchoutre (1902, pp 40-50) describió este fenómeno en *Eriobotrya japonica* (Rosaceae), y concluyó que dos óvulos se habían fusionado antes del desarrollo del tegumento externo. En *T. patula*, la formación de un primordio doble de óvulo podría tener relación con la condición bicarpelar del ovario.

El inicio de la megasporogénesis a partir de una célula hipodermal que funciona directamente como la célula madre de la megaspora, confirma la condición tenuinucelada del óvulo (sin tejido parietal),

característica de la familia Asteraceae (Pullaiah, 1978).

Generalmente el tipo de desarrollo del saco embrional es constante en un género y algunas veces en la familia. Pullaiah (1978) describe el saco embrional para las compuestas como monospórico de tipo *Polygonum*, con ocho núcleos de los que se diferencian tres células antípodas con acomodo linear. No obstante, algunos autores han descrito otros tipos, por ejemplo saco embrional bispórico en *Sanvitalia procumbens* (Helmqvist y Holmberg, 1961) y tetraspórico tipo *Drusa* en *Chrysanthemum* (Martin y Smith, 1955). En las muestras evaluadas aquí, fue frecuente observar tétrades y la degeneración de las megasporas no funcionales, por lo que en estas plantas el desarrollo es monospórico.

Asimismo, se han identificado variantes del tipo *Polygonum* en la organización celular del gametofito maduro de compuestas, ya que se reportan sacos embrionales de ocho núcleos y seis células en *Helianthus annuus* (Newcomb y Steeves, 1971) y *Flaveria repanda* (Misra, 1957). Aquí, las evidencias muestran que el gametofito maduro de *T. patula* consta solamente de siete núcleos y seis células, sin embargo, se requieren estudios adicionales de cortes transversales o montaje de óvulos enteros, para identificar bien el número y posición de los núcleos resultantes de la tercera división mitótica. No obstante se coincide con la designación de saco embrional tipo *Polygonum*, a pesar de la variación en el número de células antípodas.

Por otro lado, la formación de células multinucleadas calazales, es un evento similar a lo descrito por Davis (1964, 1968) en *Minuria integerrima* y *Calotis lappulacea*. Probablemente estas células multinucleadas son un intento de formación de saco embrional, pero carecen de la polaridad y el aparato ovocelular que son características de un saco embrional.

Se presume que las células multinucleadas proceden de megasporocitos sin reducción meiótica, puesto que no se detectaron tétrades. Davis (1964) afirmó que estas células constituyen sacos embrionales no reducidos derivados de células somáticas calazales, y por lo tanto una expresión de apomixis por aposporia.

Tomer y Gotreich (1978) describen estas mismas alteraciones en *Persea americana* y atribuyen la forma anormal del óvulo, el número irregular de núcleos y su comportamiento desorganizado, a una pérdida del mecanismo normal de control. En *T. patula* la mayoría de las células multinucleadas también se encontraron en óvulos anormales.

Consideramos que las anomalías en el desarrollo del saco embrional en *T. patula* son evidencia de la variabilidad de los procesos reproductores en la familia Compositae, y la expresión de ciertas ten-

Figuras 5-7 flor femenina. 5. Saco embrional maduro con células sinérgidas, ovocélula, célula central y antípodas 431x. 6. Embrión globular, note el lóbulo de las células antípodas persistentes 174x. 7. Dos óvulos en un mismo lóculo; un saco embrional tiene endospermo (EN) y el otro está en estadio de megagametofito maduro (SE) 195x. AN: células antípodas, CC: célula central, CE: células epidérmicas, EM:embrión, EN:endospermo, ET:endotelio, M:megaspora, MF:megaspora funcional, MI: micrópilo, OV: ovocélula, SE: saco embrional, SI: sinérgidas.

dencias hacia el desarrollo apomítico, como sugieren Asker y Jerling (1992). Estos mismos autores afirman que las células iniciales apospóricas y células semejantes a sacos embrionales, se manifiestan en plantas diploides sexuales, y que por el contrario, las poliploides relacionadas tienen sacos apospóricos funcionales. Conforme a este planteamiento, se esperaría que *T. patula* (tetraploide) presentara embriones apomíticos. Sin embargo, el reducido número de muestras anormales, la observación del tubo polínico, así como la formación de un solo embrión por semilla, son evidencias de la reproducción sexual. No obstante, es recomendable realizar estudios adicionales en la descendencia para confirmar el origen cigótico del embrión en esta especie, ya que si bien las anomalías observadas no representan una prueba determinante de apomixis, sí podemos considerarlos como eventos no comunes en el proceso reproductor. Se podría pensar que ciertas alteraciones en el desarrollo, son eventos normales en las plantas cultivadas, debido a que éstas han pasado por diferentes combinaciones genéticas que llegan a alterar la expresión de los genes involucrados en la reproducción. Sería interesante verificar si en la familia Asteraceae tales irregularidades se encuentran limitadas a especies cultivadas. Además, es importante considerar lo señalado por Stephenson (1981) respecto a que los desórdenes fisiológicos causados por competencia por recursos maternos entre las diferentes flores del capítulo, pueden ser otra de las causas posibles de las anomalías observadas.

Literatura Citada

- Asker S. 1984. Apomixis and biosystematics. En: W.F. Grant (Ed.) *Plant biosystematics*. Academic Press. Toronto, Canada. pp 237-348.
- Asker S. y Jerling L. 1992. *Apomixis in plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Chen J. F y Lin Y. J. 1982. Chromosome pairing in interspecific hybrids of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Cytologia* 47:737-742.
- Davis G.L. 1962a. Embryological studies in the Compositae. I. Sporogenesis, gametogenesis, and embryogeny in *Cotula australis* (Less.) Hook. f. *Australian Journal of Botany* 10:1-12.
- Davis G.L. 1962b. Embryological studies in the Compositae. II. Sporogenesis, gametogenesis, and embryogeny in *Ammobium alatum* R. Br. *Australian Journal of Botany* 10:65-75.
- Davis G.L. 1964. The embryology of *Minuria integrerrima* (D.C.) Benth. A somatic apomict. *Phytomorphology* 14:231-239.
- Davis G. L. 1967. Apomixis in the Compositae. *Phytomorphology* 17:270-277.
- Davis G.L. 1968. Apomixis and abnormal anther development in *Calotis lappulacea* Benth. (Compositae). *Australian Journal of Botany* 16:1-17.
- Hjelmqvist H. y Holmberg V. 1961. The development of the embryo sac in *Sanvitalia procumbens*. *Botaniska Notiser* 114:353-360.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York, 523 pp.
- Martin R.W. y Smith F.H. 1955. Megagametophyte development in *Chrysanthemum leucanthemum* L. *Botanical Gazette* 116:243-249.
- Misra S. 1957. Floral morphology of the family Compositae. I. The flower and the gametophytes of *Flaveria repanda* Lag. *Journal of the Indian Botanical Society* 36:503-512.
- Neher T.R. 1966. Monograph of the genus *Tagetes* (Compositae). Ph. D. Dissertation. Indiana University, Bloomington, 306 pp.
- Newcomb W. y Steeves T.A. 1971. *Helianthus annuus* embryogenesis: embryo sac wall projections before and after fertilization. *Botanical Gazette* 132(4):367-371.
- Péchoutre F. 1902. Contribution a l'étude du développement de l'ovule et de la graine des Rosacées. Thèse. Faculté des Sciences de Paris. 158 pp. [*Annales des Sciences Naturelles; Botanique* (Paris) ser. 8 16:1-158.].
- Pullaiah T. 1978. Studies in the embryology of Compositae. III. The tribe Astereae. *Botanical Magazine* (Tokyo) 91:197-205.
- Solbrig O.T. 1977. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. En: Heywood V.H., Harborne J.B. and Turner B.L. Edrs. *The biology and chemistry of the Compositae*. Vol I. Academic Press, London, pp. 267-281.
- Stephenson A.G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematic* 12:253-279.
- Strother L.J. 1977. Tageteae-Systematic review. En: Heywood V.H., Harborne J.B. y Turner B.L. Edrs. *The biology and chemistry of the Compositae* Vol II. Academic Press, London, pp. 769-797.
- Swarajya P.L. y Pullaiah T. 1989. A contribution to the embryology of *Youngia japonica* (L.) D. C. (Asteraceae). *Phytomorphology* 39(2,3):149-156.
- Swarajya P.L., Sarada D., and Pullaiah T. 1986. Embryology of *Dichrocephala*. *Phytomorphology* 36(3,4):257-261.
- Tomer E. and Gottreich M. 1978. Abnormalities in avocado (*Persea americana* Mill.) ovule development. *Botanical Gazette* 139(1):81-86.