

221  
24'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTRUCTURA E HISTOQUIMICA DEL DESARROLLO  
DE LA SEMILLA DE TRES VARIEDADES DE Ipomoea  
aquatica (CONVOLVULACEAE)”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**GUADALUPE VALDOVINOS PONCE**

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

I	INTRODUCCION _____	1
II	ANTECEDENTES :	
	(1) REGISTRO HISTORICO DE <i>Ipomoea aquatica</i> _____	5
	(2) UBICACION TAXONOMICA _____	6
	(3) DESCRIPCION ESPECIFICA _____	7
	(4) ORIGEN Y DISTRIBUCION _____	9
	(5) USOS _____	9
	(6) ASPECTOS AGRICOLAS _____	10
	(7) ASPECTOS ONTOGENETICOS _____	12
	(8) LATENCIA _____	18
III	OBJETIVOS _____	24
IV	MATERIAL Y METODOS _____	25
V	RESULTADOS :	
	(1) MORFOLOGIA EXTERNA _____	29
	(2) FLORACION _____	30
	(3) ANATOMIA E HISTOQUIMICA :	
	(3.1) OVULO _____	31
	(3.2) DESARROLLO DE LA TESTA _____	33
	(3.3) DESARROLLO DEL COJINCILLO _____	36
	(3.4) DESARROLLO DEL ENDOSPERMO _____	38
	(3.5) DESARROLLO DEL EMBRION _____	39
VI	DISCUSION :	
	(1) MORFOLOGIA EXTERNA _____	49
	(2) ANATOMIA _____	50
	(3) HISTOQUIMICA _____	57
	(4) IMPERMEABILIDAD _____	61
VII	CONCLUSIONES _____	64
VIII	BIBLIOGRAFIA _____	66

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1 CONTENIDO NUTRICIONAL DE 2 HORTALIZAS DE _____	4
HOJA <i>Spinacia sp</i> E <i>I. aquatica</i> .	
TABLA 2 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA GERMINACION _____	17
Y CONTENIDO DE AGUA EN SEMILLAS DE <i>I. aquatica</i> .	
TABLA 3 TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA REGISTRADAS _____	48
EN EL INVERNADERO DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO	
FIG.1 HISTOQUIMICA DE LA EPIDERMIS Y SUBEPIDERMIS _____	44
DE LA TESTA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE <i>I. aquatica</i> .	
FIG.2 HISTOQUIMICA DEL ESCLERENQUIMA EN EMPALIZADA _____	45
Y DEL PARENQUIMA DE LA TESTA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE <i>I. aquatica</i> .	
FIG.3 HISTOQUIMICA DEL COJINCILLO DURANTE EL DESARROLLO _____	46
DE LA SEMILLA DE <i>I. aquatica</i> .	
FIG.4 HISTOQUIMICA DEL DESARROLLO DEL EMBRION Y DEL _____	47
ENDOSPERMO DE <i>I. aquatica</i> .	

## RESUMEN

En este trabajo se estudiaron los cambios estructurales e histoquímicos durante el desarrollo de la semilla de tres variedades de *Ipomoea aquatica* (Large leaf, Improved large leaf y China).

Se fijaron flores en anthesis, ovarios y semillas en diferentes etapas de desarrollo y se incluyeron en parafina de acuerdo con la técnica de Johansen (1940). El material seccionado se tiñó con safranina verde fijo y se aplicaron diversas pruebas histoquímicas.

El óvulo en las tres variedades es anátropo, unitégmico y funiculado. El tegumento está formado por tres capas celulares: una protodermis e hipodermis uniestratificadas y una capa pluriestratificada de células parenquimáticas con abundantes reservas de almidón.

El tegumento da lugar a la testa que, en la semilla madura, está formada por cuatro capas: la epidermis uniestratificada diferenciada en tricomas, la subepidermis, el esclerénquima en empalizada de 3 a 4 estratos de células elongadas radialmente y el parénquima que queda reducido a una capa de paredes celulares comprimidas.

El cojincillo sigue un desarrollo diferente al observado en el resto de la testa. La epidermis queda formada por 4 a 5 estratos celulares y la subepidermis se divide periclinalmente para formar de 2 a 3 estratos de células que se elongan radialmente.

La epidermis, en la zona adyacente al cojincillo, queda formada por 3 a 4 estratos celulares.

Entre la testa y el endospermo hay una cutícula. El desarrollo del endospermo es nuclear; la formación de paredes ocurre desde la región micropilar hacia la calazal. En la semilla madura persisten de 1 a 3 estratos de células vivas y restos de paredes celulares.

El embrión ocupa la mayor parte de la semilla; cada cotiledón es bilobado, con laticíferos y plegamiento longiplicado.

De acuerdo con la histoquímica, es probable que en las tres variedades de *I. aquatica* la subepidermis, el esclerénquima en empalizada, el parénquima y la cutícula que separa la testa del endospermo, estén relacionadas con la dureza de la semilla, ya que en ellas se deposita, a partir de los 20 a 30 días después de la polinización, las sustancias relacionadas con la impermeabilidad al agua.

No se observaron diferencias estructurales ni histoquímicas en la ontogenia de las semillas de las tres variedades.

## I INTRODUCCION

El género *Ipomoea* L., perteneciente a la familia Convolvulaceae, está representado por más de 500 especies de plantas tropicales y subtropicales con algunas que llegan a distribuirse dentro de las latitudes templadas (Edie, 1969; McDonald, 1982).

Las especies de este género han llamado la atención de embriólogos vegetales y botánicos debido a su importancia económica y agrícola; ya sea como productos de valor alimenticio, medicinal u ornamental (*Ipomoea batatas*, *Ipomoea purga*, *Ipomoea tricolor*, *Ipomoea nil*) o como malezas que afectan cultivos comerciales como el de maíz y frijol (*Ipomoea purpurea*, *Convolvulus arvensis*).

Dentro del grupo de especies de importancia alimenticia se tiene a *Ipomoea aquatica* Forsk. (*I. reptans* Poir), un vegetal originario del Sureste de Asia. Se ha cultivado en Arabia, Oeste de Africa, Egipto, la India y en varias ciudades del Sureste de Asia, siendo el Sur de China el centro de su cultivo (Edie, 1969).

Se introdujo en México, en 1987, por el ahora desaparecido Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos (INIREB).

Por su alta producción de biomasa, calidad nutritiva y escasa labor requerida para su cultivo se considera que puede representar una alternativa importante en la producción de forraje en los sistemas agropecuarios de las zonas bajas tropicales del Sureste de México y también constituir una fuente alimenticia para los

pobladores (Pérez,1990).

*I. aquatica* o "espinaca de agua" como comunmente se le conoce, es una hierba anual acuática o semiacuática en condiciones naturales, aunque puede llegar a establecerse en suelos húmedos.

Prácticamente todas las partes de la planta joven son comestibles; las raíces, los tallos, los peciolos y las hojas son seleccionados y utilizados como verduras (Datta y Banerjee,1978; Tiwari y Chandra,1985)

Las hojas tienen un alto contenido protéico lo que hace de esta especie una de las mejores entre las hortalizas. Además, representan una buena fuente de vitaminas, carbohidratos, hierro, calcio y fósforo por lo que puede llegar a constituir un recurso alimenticio tan nutritivo como las hojas de espinaca (Rubertó y Martin,1975) (Tabla 1).

Cabe mencionar que los tallos, duros y correosos, así como los excedentes de la producción foliar son destinados para el consumo de ganado porcino y vacuno (Herklots,1977; Martin,1984).

En *I. aquatica* las variedades se han distinguido por medio de las características morfológicas de la planta, tales como forma y tamaño de las hojas y color de los tallos y las flores (Tisbe y Cadiz,1967; Edie,1969; Herklots,1977; Yamaguchi,1983; Tiwari y Chandra,1985).

Las variedades Large leaf, Improved large leaf y China se les considera de hoja ancha (Pérez,1990).

Esta planta se propaga sexual y vegetativamente y se ha observado que la propagación por esquejes juega un papel más importante para su cultivo, ya que el enraizamiento es rápido y la

producción mayor (Tiwari y Chandra, 1985; Linneman et al, 1986).

Datta y Biswas (1970) observaron que las semillas maduras de *I. aquatica*, recién cosechadas, poseen latencia que puede romperse por varios métodos de escarificación y reportaron que la germinación de las semillas decrecía gradualmente conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento. Primero consideraron que la latencia tenía su origen en el embrión y después, realizaron estudios anatómicos con el propósito de conocer la región o regiones de la semilla que se encontraban asociadas con la impermeabilidad al agua.

Encontraron que la estructura y el arreglo de las células del esclerénquima en empalizada representan una barrera al paso de agua y una total inhibición de la germinación.

Por otro lado, Jos (1963) estudió el desarrollo de la cubierta seminal, sin embargo, el trabajo carece de un análisis histoquímico.

Tomando en cuenta la escasa información histoquímica acerca de las causas de la dureza de las semillas de *I. aquatica*, así como la falta de estudios estructurales que permitan distinguir las variedades estudiadas en este trabajo, se pretende aportar datos embriológicos e histoquímicos para entender las causas de la dureza de la testa de *I. aquatica* y reconocer sus variedades.



Tabla 1. CONTENIDO NUTRICIONAL DE DOS HORTALIZAS DE HOJA :  
*Spinacia sp.* E *Ipomoea aquatica*. (100g/PESO FRESCO).

HORTALIZA DE HOJA

	ESPINACA DE AGUA <i>Ipomoea aquatica</i>	ESPINACA <i>Spinacia sp</i>
PROTEINA (g)	3.9	3.2
GRASAS (g)	0.6	0.3
CARBOHIDRATOS (g)	4.4	4.3
CALCIO (mg)	71.0	93.0
FOSFORO (mg)	67.0	51.0
FIERRO (mg)	3.2	3.1
VITAMINA "A" (I.U.)	4825	8100
TIAMINA (mg)	0.09	0.10
RIBOFLAVINA	0.24	0.20
NIACINA (mg)	1.3	0.6
VITAMINA "C" (mg)	49.0	51.0

(Connor, 1963; Knott y Deanon, 1967; Martin, 1984).

## II ANTECEDENTES

### (1) REGISTRO HISTORICO DE *Ipomoea aquatica*

El registro histórico de *I. aquatica* en China es muy antiguo, las primeras referencias sobre su uso datan del 290 al 307 A.C., durante la Dinastía Chin, en un libro titulado "A Description of the Plants in the South". El autor, Chi Ham, no menciona a la planta, sin embargo, por su descripción parece ser que se refiere a esta especie.

Chiang Yu Shik menciona a *Ipomoea aquatica* por su nombre chino "Ong Tsoi" en su libro "Suplement to Materia Medica" escrito durante la Dinastía Sung (1056-1063).

Lee Shih Chan da a conocer el origen de su nombre en su libro "An Outline of Materia Medica" escrito durante la Dinastía Ming (1590-1596):

#### "Ong Tsoi"

Ong - Planta enterrada bajo el suelo.

Tsoi - Vegetal

El significado del caracter Ong se deriva a partir de la forma de su propagación: la especie era cultivada alrededor y al Sur de la desembocadura del Río Yangtze a partir de esquejes que eran enterrados en suelos ricos en nutrientes.

Se conoce otro significado (vasija de barro para llevar agua) que surge a partir de la observación de que la planta crecía en unas vasijas de barro que eran llevadas por los Taiwanesees durante su huida de Fukien (Edie y Ho, 1969).

**(2) UBICACION TAXONOMICA**

**DIVISION : Magnoliophyta**  
**CLASE : Magnoliopsida**  
**SUBCLASE : Asteridae**  
**ORDEN : Solanales**  
**FAMILIA : Convolvulaceae**  
**GENERO : *Ipomoea***  
**ESPECIE : *I. aquatica***

**(Cronquist, 1988).**

**SINONIMIA**

- \* *Ipomoea aquatica* Forsk.**
- \* *Ipomoea reptans* (L.) Poir.**
- \* *Ipomoea repens* Roth.**

**(Herklots, 1977).**

### (3) DESCRIPCION ESPECIFICA

*I. aquatica* es una hierba anual o perenne que se puede encontrar en áreas pantanosas, húmedas o flotando en el agua en muchas regiones tropicales del mundo (Martin, 1984; Tiwari y Chandra, 1985).

Los tallos son huecos, succulentos y lisos. Bajo condiciones naturales los tallos principales crecen horizontalmente sobre la superficie húmeda; los ramas laterales llevan las hojas y las flores y pueden crecer horizontal o verticalmente dependiendo de la profundidad del agua (Edie, 1969; Snyder et al, 1981).

Las hojas, pecioladas, son de forma triangular o lanceolada y de base acorazonada. La punta puede ser aguda o redonda. Su tamaño varía bajo condiciones de cultivo, pero normalmente es de 2.5 a 15 cm de longitud, considerando el peciolo y de 0.5 a 10 cm de ancho.

Los peciolos de color verde pálido o púrpura, son largos y carnosos y surgen individual y alternadamente de los nudos de las ramas laterales (Tisbe y Cadiz, 1967; Edie, 1969; Cornelis et al, 1985).

Las flores, infundibuliformes, miden de 4 a 7.5 cm de longitud y 5 cm de diámetro; son axilares y surgen individualmente o en grupos de 2 a 7. La corola puede ser totalmente blanca, rosa o púrpura o bien, presentar alguna combinación con estas tonalidades (Snyder et al 1981).

El fruto es una capsula ovoide glabra y de color café, mide aproximadamente de 7 a 9 cm de diámetro. Cada fruto produce de 2 a 4 semillas pubescentes o glabras de color café y de forma angular o redonda (Snyder et al, 1981; Cornelis et al ,1985).

Tomando en cuenta algunas características morfológicas, tales como forma y tamaño de las hojas y color de los tallos y flores, los agricultores asiáticos pueden reconocer de dos a cuatro variedades:

(1) "Ching Quat" - cultivo de hojas angostas y tallo de color verde.\*<sup>1</sup>

(2) "Pak Quat"- cultivo de hoja ancha y tallo de color blanco.\*<sup>2</sup>

(3) Kang Koong beeasa - hojas de color verde oscuro, tallos y flores de color púrpura.

(4) Kang Koong nagree - hojas de color verde amarillento, tallos amarillentos y flores de color blanco.

\*<sup>1</sup> Hon ung ts'oi.

\*<sup>2</sup> Shui ung ts'oi.

(Tisbe y Cadiz,1967; Edie,1969; Herklots,1977; Yamaguchi,1983; Tiwari y Chandra,1985).

#### (4) ORIGEN Y DISTRIBUCION

El origen de *I. aquatica* aún no ha sido determinado.

Se han propuesto varios centros de origen como : el Sur de Asia, Malasia y Taiwan (Morton y Sneyder,1976); la India (Herklots,1977; Yamaguchi,1983) o el Sur de China (Plucknett y Beemer,1981).

*I. aquatica* se distribuye ampliamente en Asia tropical, Africa, Oceanía y América (Bruemmer y Roe,1979)

Los chinos la llevaron a Brazil, las Guyanas, América Central, Trinidad, Jamaica, Cuba y otras islas del Oeste de la India (Snyder et al.1981).

Ha sido también introducida con buen éxito en las Islas Fidji, Hawaii y Florida (Morton y Snyder,1976).

En 1987 se introdujo en México por el Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos (Pérez,1990).

#### (5) USOS

*I. aquatica* juega un papel importante en la economía de los países asiáticos.

Por sus propiedades medicinales se emplea como laxante suave, emético, tranquilizante y para contrarrestar los efectos de la hemorroides y de la fiebre.

También es utilizada como hortaliza de hoja y como forraje para la alimentación de ganado porcino y vacuno (Herklots,1977; Datta y Banerjee, 1978; Tiwari y Chandra,1985).

## (6) ASPECTOS AGRICOLAS

La mayoría de los estudios que se han realizado con *I. aquatica* están relacionados básicamente, con aspectos bromatológicos y agrícolas debido a su importancia alimenticia.

Knott y Deanon (1967), Edie y Ho (1969), Herklots (1977), Snyder et al. (1981), Martin (1984), Cornelis et al. (1985) y Tiwari y Chandra (1985) dieron a conocer las técnicas de cultivo que pueden ser utilizadas para la producción de *I. aquatica*, considerando los siguientes aspectos:

- (1) Descripción Botánica
- (2) Variedades
- (3) Sistemas y requerimientos para el cultivo
- (4) Métodos de cosecha
- (5) Producción
- (6) Características bromatológicas
- (7) Enfermedades.

En México, *I. aquatica* ha sido objeto de diversas investigaciones ya que constituye una alternativa potencial para aprovechar terrenos húmedos en donde pocas plantas forrajeras prosperarían.

Las primeras observaciones sobre su crecimiento y consumo por animales se han realizado en el Centro Regional de Enseñanza, Capacitación e Investigación para el Desarrollo Agropecuario del Trópico Húmedo (CRECIDATH) del Colegio de Posgraduados, en donde

se ha empleado como alimento para la engorda de ganado porcino (Olguín, 1989 En: Pérez, 1990).

Pérez (1990) realizó una serie de investigaciones con el propósito de conocer la eficiencia productiva y fotosintética de tres cultivares de *I. aquatica* cuando son sometidos a diferentes condiciones ambientales (humedad, intensidad de la luz y temperatura de hoja) y de manejo (método de cultivo, altura y frecuencia de corte). Encontró diferencias entre estas variedades, en relación con el intercambio gaseoso como respuesta a la diferente densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) y de temperatura:

La variedad Improved large leaf presentó la más baja conductancia para las diferentes temperaturas. Para las variedades China y Large leaf la máxima conductancia se mantuvo, para todos los niveles de DFFF, a una temperatura de 15°C y para la variedad Improved large leaf a 30°C.

En cuanto a fotosíntesis aparente, observó que la variedad Improved large leaf presentó, para todos los niveles de temperatura y DFFF, la menor tasa fotosintética en comparación con las otras dos variedades, entre las cuales la tasa fué muy similar.

Comparando la eficiencia de uso de agua se encontró una mayor eficiencia para la variedad China y menor y muy similar en las otras dos variedades, las cuales difirieron sólo para las temperaturas de 15 y 20°C.

En cuanto al rendimiento de materia seca, no encontró



diferencias entre las variedades para la misma condición de humedad del suelo, pero el rendimiento fué mayor bajo inundación.

En el CRECIDATH, Pérez y Villanueva (Pérez, com.pers.) llevaron a cabo un trabajo con el propósito de conocer los polinizadores y los mecanismos de polinización en esta especie.

Observaron, que a pesar de ser una planta de reciente introducción en México, no presenta problemas de polinización bajo condiciones de campo, siendo los principales polinizadores abejas y avispas de las familias Halictidae, Anthophoridae, Vespidae y Apidae.

#### (7) ASPECTOS ONTOGENETICOS

Entre los primeros trabajos que han contribuido al conocimiento de la embriología de diferentes géneros pertenecientes a la familia Convolvulaceae están los realizados por Kenyan (1929), Juliano (1935), Tiwari (1936), Rao (1940), Woodcock (1942) y por Sripleng y Smith (1960) (Jos, 1963).

Corner, 1976 En: Jos, 1963, recopiló información sobre la anatomía de la cubierta seminal de varios miembros de la familia Convolvulaceae; Sampathkumar y Ayyangar (1982) describieron las características morfoanatómicas de las semillas maduras de 33 especies de la familia, entre las cuales se encuentra *I. aquatica*.

Márquez (1986) estudió la estructura e histoquímica del desarrollo de la semilla de *Turbina corymbosa* y señala los sitios

de la cubierta que pueden ser los responsables de la dureza de la semilla.

Murguía (1986) realizó un estudio comparativo entre las semillas maduras de dos especies arbóreas del género *Ipomoea*: *I. murucoides* e *I. pauciflora*. Encontró que las semillas son morfológicamente semejantes entre sí, pero difieren anatómicamente en el número de estratos epidérmicos que constituyen la región adyacente al cojincillo.

López-Curto, et al (1990) estudiaron el ciclo de vida y desarrollo de la semilla de *Ipomoea x leucantha*, ya que esta especie reduce la producción y la comercialización del arroz en México. Encontraron que la planta presenta un ciclo de vida de 115 días bajo condiciones de laboratorio. Por otro lado, observaron que la estructura de la semilla presenta las características distintivas de las semillas de la familia Convolvulaceae y que el desarrollo del embrión es sustentado por el endospermo y por el parénquima de la testa.

Ponce, et al (1990) estudiaron el desarrollo de la testa de *Ipomoea purpurea*, relacionando su estructura e histoquímica con la impermeabilidad al agua. Encontraron que el único tegumento del óvulo se transforma en una cubierta seminal formada por cuatro capas: la epidermis, la subepidermis, el esclerénquima en empalizada y el parénquima; y de acuerdo con la estructura e histoquímica de la cubierta, concluyeron que la subepidermis el esclerénquima en empalizada y la cutícula que separa la testa del

endospermo pueden estar relacionados con la impermeabilidad de la testa al agua.

Gutiérrez (1990) estudió la anatomía e histoquímica del desarrollo de la semilla de *Dichondra sericea* con el objeto de aportar elementos estructurales para la mejor comprensión y ubicación taxonómica del género, ya que se tienen algunos estudios que muestran gran polémica en cuanto a su clasificación.

El único trabajo sobre el desarrollo de la semilla de *J. aquatica*, es el de Jos (1963); en éste se compara la estructura seminal con la de otros géneros pertenecientes a la misma familia.

El autor encontró que las flores son pentámeras y que poseen un gineceo tri o tetralocular con uno o dos óvulos por lóculo; el ovario es globoso y el estilo es largo con dos estigmas lobados y papilosos. Observó que el óvulo es unitégmico, tenuinucelar y anátropo, presenta un corto funículo a través del cual viaja el haz vascular hasta alcanzar la región calazal y desciende por el antirrafe, terminando cerca del micrópilo. El tegumento está constituido por una epidermis de células rectangulares con núcleos grandes y una capa uniestratificada de células hipodérmicas. Después de esta capa observó aproximadamente 15 estratos de células parenquimatosas.

El gametofito femenino es monospórico octanucleado. El saco embrionario es angosto, recto y se extiende casi a todo lo largo del óvulo. Después de la fecundación, la división del núcleo primario del endospermo y la del cigoto ocurren casi

simultaneamente.

El endospermo es nuclear pero más tarde llega a celularizarse desde la región micropilar a la calazal.

La primera división del cigoto es transversal y da lugar a una célula apical hacia la región calazal y una célula basal hacia la región micropilar, esta última célula forma un suspensor masivo de forma piramidal mientras que la célula apical se divide y diferencia en el embrión. En etapas tardías el cotiledón es bilobado y sus células no son homogéneas. Entre las células parenquimatosas observó otras células de mayor tamaño y con un núcleo muy grande.

Finalmente, observó que en el tegumento se suceden una serie de cambios histológicos para dar lugar a la cubierta de la semilla, la cual está formada, al final del desarrollo, por una epidermis, subepidermis y por dos a tres estratos de células que forman la capa del esclerénquima en empalizada; sin embargo, en la región micropilar esta última presenta 5 estratos celulares. Se tienen únicamente cerca de 10 estratos de células parenquimatosas, el resto fueron consumidas por el embrión.

Datta y Biswas (1970) relacionaron la estructura de la cubierta seminal con el proceso de germinación. Encontraron que la capacidad de germinación de las semillas disminuía gradualmente conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento y al mismo tiempo observaron una pérdida considerable de humedad (Tabla 3).

El mayor porcentaje de germinación se registró para las semillas almacenadas durante 3 días, con un contenido de humedad

del 51.8%. Después de 15 días de haberse llevado a cabo la cosecha, el contenido de agua en las semillas decreció hasta el 22 % presentando una tasa de germinación del 0%.

Concluyeron que las semillas se encontraban en un estado de latencia secundaria; con el objeto de encontrar las condiciones favorables que desencadenaran su germinación, se trataron con diferentes niveles de temperatura y fotoperiodo; sin embargo, estos factores no promovieron la germinación.

Los embriones de las semillas almacenadas durante 15 días se incubaron, bajo luz y oscuridad, a 20 y 25°C, logrando germinar 24 horas después. Estos resultados los conducen a concluir que los embriones son viables y que la latencia secundaria está dada por el embrión mismo.

Considerando la dureza de las semillas y la posible presencia de una cubierta cerosa en relación con la latencia secundaria, las semillas se escarificaron mecánica (semillas talladas en la región micropilar) y químicamente (semillas tratadas con ácido sulfúrico), logrando altas tasas de germinación.

En la parte histológica de esta investigación observaron que una semilla inmadura presenta una epidermis bien definida y con numerosos tricomas; al madurar, se deposita sobre las células epidérmicas una sustancia de color café y se desarrolla una cutícula oscura.

Señalan que, al igual que *Ipomoea crassicaulis*, las semillas de *I. aquatica* son bitégmicas, presentando una testa externa y un tegmen interno.

Observaron que la testa está constituida por 3 a 8 estratos de células columnares con paredes gruesas y de lumen angosto (macroesclereidas) y propusieron que el arreglo de estas células le confiere la impermeabilidad al agua y a otros factores externos. El tegmen consta de 6 a 10 estratos de células parenquimatosas que contienen abundantes gránulos de almidón.

Estas últimas observaciones les permiten establecer que la naturaleza de la latencia secundaria en las semillas maduras de *J. aquatica* está dada por la testa, la cual impide la permeabilidad al agua y una total inhibición de la germinación.

Tabla 2: Efecto del almacenamiento sobre la germinación y contenido de agua en semillas de *J. aquatica*.

(Datta y Biswas, 1970).

DIAS DESPUES DE LA COSECHA	CONTENIDO DE HUMEDAD (% PESO SECO)	PORCENTAJE DE GERMINACION
0	146.2 ± 8.5	0
3	51.8 ± 4.3	83 ± 7
6	37.7 ± 3.2	32 ± 6
9	34.3 ± 2.8	21 ± 3
12	25.8 ± 2.2	10 ± 3
15	22.1 ± 1.6	0
18	19.6 ± 2.8	0

## (8) LATENCIA

La semilla desempeña un papel importante en la conservación y diseminación de las especies que la poseen (Esau, 1987).

La doble fecundación estimula el desarrollo y la diferenciación del óvulo que culminan con la formación de una semilla. El cigoto, producto de la fusión de uno de los núcleos espermáticos con la ovocélula, da origen al embrión, el cual representa el desarrollo parcial del nuevo esporifito; el núcleo primario del endospermo, resultado de la fusión de los núcleos polares y el segundo gameto masculino, da lugar al endospermo y los tegumentos forman la cubierta protectora.

De este modo, los diferentes detalles estructurales del óvulo se conservan en diferentes grados durante su transformación en la semilla. Cada uno de estos sucesos ocurren en una serie de etapas interdependientes que siguen una secuencia característica (Bhojwani y Bhatnagar, 1981; Esau, 1987).

El embrión sólo, o el embrión y el endospermo, ocupan el volumen mayor de la semilla, mientras que los tegumentos sufren una serie de cambios histológicos significativos.

El micrópilo puede permanecer visible como un poro obliterado.

El funículo es un pedúnculo que une al óvulo con el ovario; cuando se separa la semilla del ovario se observa como una pequeña cicatriz conocida como hilio (Esau, 1987).

En óvulos bitégmicos la cubierta seminal puede derivarse de ambos tegumentos (*Gossypium sp*, *Ricinus sp*) o bien, el tegumento

interno puede desaparecer durante la ontogenia de la semilla y la cubierta queda formada únicamente por el tegumento externo (Cucurbitaceae, Fabaceae) (Bhojwani y Bhatnagar, 1981).

La semilla así formada, sigue tres fases distintas en su desarrollo:

- \* Fase de división celular
- \* Fase o etapa de crecimiento
- \* Periodo de acumulación de sustancias de reserva
- \* Periodo de maduración

El periodo de maduración se caracteriza por una reducción general en el metabolismo debido a que la semilla ha perdido humedad (Bidwell, 1979; Allison et al, 1986). Cuando las semillas alcanzan esta última etapa, indican el estado inicial de una nueva planta, la cual se desarrollará cuando se lleve a cabo el proceso de germinación.

El agua es uno de los factores principales para que se realice este proceso, ya que la semilla madura mantiene una condición de humedad extremadamente baja (5-10%) en relación con su peso seco (Larqué y Trejo, 1990). De este modo, la rehidratación de las semillas constituye una etapa esencial para la germinación.

Las semillas de muchas especies (*Phaseolus sp*, *Pisum sp*, *Zea mays*) pueden germinar inmediatamente después de que se desprenden de la planta madre si se tienen disponibles condiciones favorables de humedad, temperatura y aereación.

Muchas otras semillas no germinan aún cuando se encuentran en condiciones ambientales favorables. Este periodo, que varía de una especie a otra se conoce como periodo de latencia (Bhojwani y



Bhatnagar, 1981).

En general, se reconocen dos mecanismos que causan el estado de latencia en las semillas:

(1) Latencia impuesta por el embrión

(2) Latencia impuesta por la cubierta seminal o testa

El tipo más común de latencia es aquél, en el que el embrión requiere de un cierto periodo de tiempo después de la cosecha (postmaduración) para poder germinar. Durante este periodo el embrión puede sufrir una maduración estructural (Ranunculaceae) o fisiológica (Rosaceae).

Los cambios fisiológicos pueden estar asociados con la presencia de inhibidores o bien, con la ausencia de promotores de crecimiento (Bhojwani y Bhatnagar, 1981; Bidwell, 1979).

En algunas ocasiones las semillas viables no absorben el agua de tal manera que la germinación no ocurre aún bajo condiciones favorables.

Las semillas que son incapaces de absorber el agua son comunmente conocidas como semillas duras o impermeables y representan el tipo de latencia generado por la cubierta seminal o testa (Quinlivan, 1971),

Las semillas duras se presentan en muchas especies de las familias Leguminosae (Fabaceae), Anacardiaceae, Liliaceae, Malvaceae, Convolvulaceae, Cannaceae, Geraniaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae y Rhamnaceae (Quinlivan, 1971; Rolston, 1978). Sin embargo, varios autores concuerdan en que esta condición es

especialmente característica de las semillas de la familia Leguminosae, de la cual se han derivado la mayoría de los estudios sobre semillas duras (Watson,1948).

A pesar de que se han realizado numerosas investigaciones en torno al tipo de latencia impuesto por la cubierta seminal, existen discrepancias sobre los componentes celulares que le confieren la impermeabilidad a la semilla. Algunos autores han registrado que la cutícula constituye la barrera que impide el movimiento de agua hacia el interior de la semilla (Watson,1948; Mckee,1977; Rolston,1978 ;Bevilacqua, et al, 1985).

También se ha considerado al esclerénquima empalizada como una característica común de las semillas duras debido a su estructura y naturaleza química. Lute (1928), Raleigh (1930) y Spurny (1972) En:Rolston (1978) atribuyen la dureza de la semilla a los engrosamientos de la pared celular. Sin embargo, también se considera que la base de las células del esclerénquima constituye la barrera de impermeabilidad debido a la presencia de lignina y sales. Otros autores la asocian con incrustaciones de suberina y cutina. (Rolston,1978).

Aunque se conoce muy poco sobre la naturaleza y función de la línea clara, muchos investigadores coinciden en señalar que esta región representa la barrera que impide el movimiento libre de agua hacia el interior de algunas semillas de leguminosas (Watson,1948; Mckee,1977; Rolston,1978; Bevilacqua, et al,1985).

Hasta el momento, se ha atribuido el estado de latencia de la semilla a una capa en particular de la cubierta seminal. Sin

embargo, algunos autores consideran que la dureza de la semilla puede ser el resultado de la interacción de dos o más capas.

Watson (1948) trabajó con 21 especies de la familia Papilionaceae con el propósito de relacionar la estructura y composición química de la cubierta seminal con la germinación de las semillas. Demuestra que las características estructurales y químicas de la testa no siempre se encuentran asociadas con las especies que presentan bajos porcentajes de germinación. Se observó que las semillas de *Melilotus albus*, las cuales presentan porcentajes de germinación del 14%, tienen un esclerénquima empalizada con paredes engrosadas y con depósitos de cutina y suberina. Esta capa presenta una naturaleza muy similar en las semillas de *Melilotus officinalis*, la cual presenta porcentajes de germinación altos y bajos. Las osteosclereidas están constituidas, en la mayoría de los casos, de materiales más permeables de tal manera que no representan un problema en la imbibición de las semillas.

Concluyen que la presencia de suberina y cutina en la capa subcuticular y el engrosamiento y la naturaleza química de las células malpighianas encontrados en cada especie justifican las altas tasas de impermeabilidad.

Mckee et al (1977) trabajaron con semillas de *Coronilla varia* con el objeto de determinar la región o regiones de la cubierta que se encuentran asociadas con la impermeabilidad. Concluyen que la cutícula, células de Malpigi, osteosclereidas y la capa de aleurona influyen en la imbibición de la semilla.

Bevilacqua et al (1985) concluyen que a pesar de que la

cutícula, la subepidermis y el esclerénquima en empalizada están involucrados en el mantenimiento de la impermeabilidad, el estado de latencia de las semillas de *Cercis siliquastrum* está dado por la completa impermeabilidad del hilo y de una capa no celular de naturaleza lipóide situada entre la superficie interna del tegumento y el endospermo.

Estos trabajos apoyan los resultados obtenidos por Ballard (1973) En: Rolston (1978), en donde se concluye que la impermeabilidad de las semillas está dada por debajo de la línea clara, a niveles más profundos.

Se han realizado numerosos trabajos en donde se relaciona el color de la semilla con la impermeabilidad al agua (Rolston, 1978).

Marbach y Mayer (1974, 1975) proponen que durante la deshidratación de las semillas de chícharo ocurre la oxidación de compuestos fenólicos localizados en la cubierta bajo la acción de la catecol oxidasa, lo que da lugar a cubiertas seminales impermeables al agua. Debido a que la actividad de la catecol oxidasa depende de la presencia de oxígeno, las condiciones de almacenamiento y las que prevalecen durante el desarrollo y maduración de las semillas pueden afectar la permeabilidad.

Observaron también, que la actividad de la catecol oxidasa incrementaba gradualmente durante el desarrollo de la semilla, presentando su máxima actividad cuando las semillas empezaban a perder humedad. Se propone que al aumentar el estrés hídrico tienen lugar una serie de reacciones que dan como resultado cambios en la permeabilidad y en el color de la cubierta.

### III OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL :

\* Estudiar la estructura e histoquímica del desarrollo de la semilla de tres variedades de *Ipomoea aquatica*.

#### OBJETIVOS PARTICULARES :

\* Establecer la etapa en la cual se inicia el depósito de sustancias asociadas con la impermeabilidad al agua.

\* Relacionar la estructura e histoquímica de la testa con la dureza de la semilla.

\* Comparar la estructura e histoquímica seminal entre las tres variedades de *Ipomoea aquatica*.

#### IV MATERIAL Y METODOS

El material de estudio se obtuvo de plantas de *I. aquatica* correspondientes a tres cultivares de hoja ancha (Large leaf, Improved large leaf y China), mantenidas bajo condiciones de invernadero en el Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo de México.

Una vez que las plantas alcanzaron la etapa de floración, se marcaron y polinizaron manualmente flores en antesis con el objeto de asegurar la fecundación de los óvulos y de obtener la secuencia completa de la diferenciación del óvulo en semilla.

Se cosecharon flores en antesis, frutos en diferentes etapas de desarrollo y semillas maduras.

La cosecha de los estadios tempranos de desarrollo se llevó a cabo 24 horas después de haber polinizado las flores, las etapas posteriores fueron cosechadas a intervalos de 5 días hasta los 55 días después de la antesis, de tal manera que se tuvo un total de 12 etapas.

El periodo de cosecha comprendió los meses de octubre a diciembre de 1990 y los meses de enero y febrero de 1991. Durante este tiempo, las plantas se trataron con Protefol y Penfol para controlar las plagas de mosquita blanca (*Bremisia sp*) y araña roja (*Tetranychus sp*). También se aplicó un fertilizante a base de fósforo, nitrógeno y potasio, de acuerdo con Pérez (1990).

Antes del periodo de muestreo las plantas se sometieron a un estrés hídrico y se aplicaron metonil (lanatee) y propargite (omite) para controlar las plagas antes mencionadas.

La temperatura y humedad relativa prevaescentes durante la etapa reproductiva de la especie en cuestión se registraron diariamente con un Higrotermógrafo (Serdex, Pittsburg, P.A. U.S.A.). (Tabla 3) (La temperatura y humedad media mensual se obtuvieron a partir del promedio de los valores registrados diariamente).

Se obtuvieron ejemplares que se depositaron en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME).

Se diseccionaron ovarios y semillas de cada una de las tres variedades, se fijaron en F.A.A., se deshidrataron en series graduales de alcohol etílico y se incluyeron en parafina de acuerdo con la técnica de Johansen (1940), considerando las siguientes modificaciones para la infiltración de semillas maduras y próximas a madurar :

- \* Escarificación en la región calazal.
- \* Imbibición en agua por un tiempo de 24 hrs.
- \* Seccionado de la semilla en pequeños fragmentos.
- \* Eliminación del paso por xilol puro.

Las muestras obtenidas se seccionaron de 8 a 10 micras de grosor en un Micrótopo Rotatorio.

Para observar la estructura celular los cortes se desparafinaron y se tiñeron con la técnica doble Safranina-Verde fijo (E.M. Engleman, com. pers.)

En el análisis histoquímico se aplicaron las siguientes pruebas:

- (1) Acido Peryódico - Reactivo de Schiff (A.P.S.) (Polisacáridos insolubles) (E.M. Engleman, com. pers.).

- (2) Azul Mercúrico de Bromofenol (Proteínas) (Mazia, et al.1953)
- (3) Negro de Naftol (Proteínas) (E.M. Engleman, com. pers.)
- (4) Permanganato de Potasio (Taninos) (E.M. Engleman, com. pers.)
- (5) Cloruro Férrico (Taninos) (Curtis,1986).
- (6) Sulfato Férrico (Taninos) (Johansen,1940).
- (7) Rojo "D" de Aceite (Lípididos) (E.M.Engleman, com. pers.)
- (8) Cloroyoduro de Zinc (Cutina, suberina, lignina, celulosa o hemicelulosa (Jensen,1962).
- (9) Lugol (Almidón) (Johansen,1940).
- (10) Fluoroglucina Acido Clorhídrico (Lignina) (Johansen,1940).
- (11) Rojo de Rutenio (Pectinas) (Curtis,1986).
- (12) Alizarina (Calcio) (Smith,1977).

Se hicieron observaciones de la morfología interna y externa de las semillas en el Microscopio Estereoscópico y en el Microscopio Electrónico de Barrido (M.E.B.) JEOL JMS-35.

Procesamiento del material para las observaciones en el Microscopio Electrónico de Barrido :

(1) Morfología externa:

Se trabajó con material deshidratado. Este se pegó en el portamuestras con adhesivo de plata y se cubrió con oro para su observación.

(2) Morfología interna :

Se trabajó con semillas hidratadas. El material se fijó en Glutaraldehido - Paraformaldehido al 3% durante 24 horas, se enjuagó con amortiguador de Colidina (0.1M, pH 7.2) - Sacarosa (0.12M) 1:1 diluido en agua destilada y se postfijó en



Tetróxido de Osmio al 1% por 30 minutos. El material nuevamente se enjuagó con el amortiguador de Colidina - Sacarosa y se deshidrató en series graduales de alcohol etílico hasta alcohol al 100%; finalmente, se hizo un cambio en acetona absoluta. El material se desecó a punto crítico, se pegó al portamuestras con adhesivo de plata y se cubrió con oro para su observación.

Se determinó el color de las semillas maduras e inmaduras tomando como referencia el catálogo de colores de Kornerup y Wanscher (1978).

## V RESULTADOS

### (1) MORFOLOGIA EXTERNA

Las plantas de las tres variedades de *J. aquatica* presentan tallos huecos de color verde claro.

Los tallos principales generalmente tienen un diámetro mayor al de los tallos secundarios o laterales de los cuales surgen, alternadamente, las hojas y las flores. Pueden observarse pequeñas protuberancias asociadas a la porción basal de los tallos principales.

Las hojas son pecioladas, glabras y de color verde oscuro. Se distinguen, en una misma planta, hojas de forma lanceolada y triangular. El margen es entero y liso, la base acorazonada y la punta aguda o redonda.

Los pecioloos surgen individualmente de las ramas secundarias y, al igual que las hojas, carecen de tricomas.

Las flores de las tres variedades son hermafroditas y presentan simetría radial (Lámina I fig.1). El cáliz está representado por cinco sépalos libres imbricados de color verde. Los pétalos se fusionan para dar lugar a una corola infundibuliforme de color blanco.

Los verticilos sexuales, androceo y gineceo, están constituidos respectivamente, por cinco estambres libres que varían en longitud y por un ovario supero, bicarpelar, bilocular en donde se observan dos óvulos por lóculo, uno de los cuales generalmente es abortivo.

Las flores son axilares y surgen en grupos de dos o individualmente.

El fruto es una cápsula glabra indehisciente de color café cuando ha madurado (Lámina I fig.2). Generalmente se producen tres semillas, las cuales son de color blanco en etapas inmaduras.

La semilla madura deshidratada es impermeable, pubescente y de forma ligeramente ovalada; en la mayoría se distingue una superficie convexa y dos planas (Lámina I figs.3 y 4). En la cara ventral de la semilla, hacia la región micropilar, se encuentra el cojincillo; éste representa una superficie pubescente, ligeramente hundida y de forma redonda (Lámina I fig.5).

La testa es de color café grisáceo a café oscuro en la variedad 1 (Large leaf) y de color café camello a café en la variedad 2 (Large leaf improved) y en la variedad 3 (China).

## (2) FLORACION

Durante el periodo de cosecha se observó que la máxima producción de flores ocurre en los meses de octubre y diciembre. La duración de la antesis es de día y medio.

LAMINA I

Fig.1 Flor en antesis

Fig.2 Fruto

Fig.3 Semilla madura deshidratada.

M.E.B. 200X.

Co (Cojincillo)

Fig.4 Superficie de la

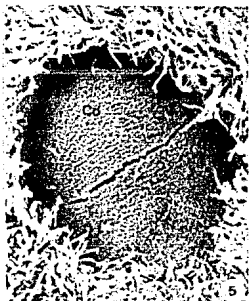
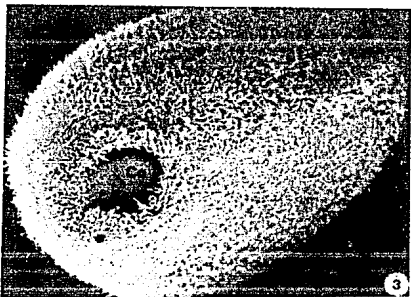
semilla madura  
deshidratada.

M.E.B. 261X.

Tr (Tricomas)

Fig.5 Cojincillo.

M.E.B. 600X.



### (3) ANATOMIA E HISTOQUIMICA

#### (3.1) OVULO

El gineceo de las tres variedades de *J. aquatica* está formado por un ovario globoso y por un estilo sólido y largo que culmina en dos estigmas lobados y papilosos.

El ovario es bicarpelar, bilocular con dos óvulos por lóculo (Lámina II fig.1).

El óvulo es crasinucelado, anátropo, unitégmico y con placentación axial; se encuentra unido al ovario por medio de un corto funículo a través del cual penetra el haz vascular (Lámina II figs.2 y 3). El tejido vascular alcanza la región calazal y desciende por la antirrafe terminando muy cerca del micrópilo.

El saco embrionario es angosto y al igual que el canal micropilar está rodeado por numerosos gránulos de almidón (Lámina II fig. 4).

De las células que forman al saco embrionario únicamente se observaron las sinérgidas y los núcleos polares de la célula central, los cuales están muy desplazados hacia la región micropilar, ubicándose por arriba de las sinérgidas (Lámina II fig.5).

Las sinérgidas son células muy grandes de forma cónica cuyo extremo más agudo está dirigido hacia el micrópilo; su citoplasma es denso y presentan una gran vacuola (Lámina II fig.6).

El tegumento está constituido por tres capas celulares :

Una protodermis e hipodermis formadas por un sólo estrato de células pequeñas de forma cúbica y rectangular, de pared delgada y de núcleos grandes; y una capa formada por 18 a 22 estratos de células parenquimáticas (Lámina III fig.1).

A partir de la antesis y durante la ontogenia de la semilla se suceden una serie de cambios estructurales e histoquímicos :

- (1) El tegumento dará lugar a la testa
- (2) El núcleo primario del endospermo, producto de la unión de un núcleo espermático con los núcleos de la célula central, se desarrollará en el endospermo
- (3) El cigoto, producto de la fusión del segundo gameto masculino con la ovocélula, formará el embrión.

## LAMINA II

- Fig.1 Corte transversal de ovario.  
Variedad Large leaf.  
12.8X. Al negativo. Campo Claro (C.C.)  
L (Lóculo)  
Nec (Nectario)  
Ov (Óvulo)  
Pov (Pared del ovario)  
Sep (Septa)
- Fig.2 Corte longitudinal de botón floral.  
Variedad Improved large leaf.  
500X. Al negativo. C.C.  
CMM (Célula madre de la megaspora)  
Cp (Células parietales)  
Ep (Epidermis)
- Fig.3 Corte longitudinal de ovario en antesis.  
Variedad Improved large leaf.  
33X. Al negativo. C.C.  
Co (Cojincillo)  
F (Funiculo)  
Ob (Obturador)  
S (Saco embrionario)  
Tg (Tejumento)
- Fig.4 Corte longitudinal de botón floral 1 día antes de la antesis.  
Variedad Improved large leaf.  
66X. Al negativo. C.C.  
Alm (Almidón)  
Cmi (Canal micropilar)  
Pa (Parénquima)  
S (Saco embrionario)
- Fig.5 Corte longitudinal de óvulo un día después de la polinización.  
Variedad China.  
250X. Al negativo. C.C.  
Np (Núcleo polar)  
S (Saco embrionario)  
Si (Sinérgida)
- Fig.6 Corte longitudinal de óvulo 1 día después de la polinización.  
Variedad Improved large leaf  
250X. Al negativo. C.C.  
Emi (Extremo micropilar)  
Si (Sinérgida)  
Vc (Vacuola)





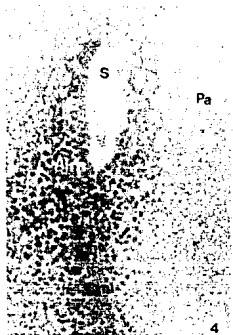
1



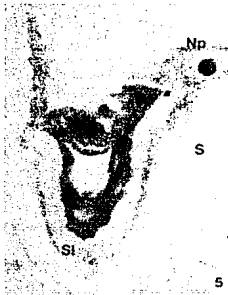
2



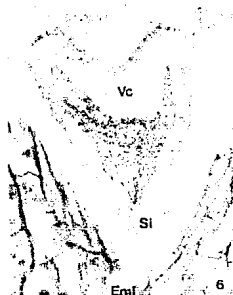
3



4



5



6

### (3.2) DESARROLLO DE LA TESTA

Venticuatro horas después de la antesis las células de la protodermis e hipodermis se elongan en dirección perpendicular a la superficie de la semilla y se dividen anticlinalmente. Las células hipodérmicas se dividen también en el plano periclinal. (Lámina III fig.2).

El parénquima, con abundantes reservas de almidón, empieza a ser degradado.

A los 10 días, la protodermis se ha diferenciado en pequeños tricomas que aún conservan su núcleo y citoplasma. La hipodermis se dividió para dar lugar a dos estratos celulares: una capa externa de células pequeñas y rectangulares cuyo eje mayor es paralelo a la superficie de la semilla, la subepidermis; y una capa interna de células rectangulares alargadas radialmente que se diferenciarán en el esclerénquima en empalizada (Lámina III fig.3).

Estas tres capas dan reacción positiva al A.P.S. evidenciando polisacáridos insolubles en las paredes celulares; los núcleos de las células que las constituyen se tiñen de azul con el Azul Negro de Naftol, indicando la presencia de proteínas.

A los 15 días, la capa interna de la hipodermis se dividió periclinalmente para dar lugar a 3 o 4 estratos de células elongadas radialmente (Lámina III fig.4).

A los 26 días, en esta misma capa, el estrato adyacente a la subepidermis se distingue de los internos por presentar una elongación radial mayor (Lámina III fig.5)

Las células parenquimáticas crecen, su citoplasma se reduce y el núcleo es desplazado hacia la periferia.

A los 30 días las células subepidérmicas conservan aún su núcleo. Aumenta el grosor de las paredes celulares del esclerénquima y, en esta capa, se observa un aumento de tinción, tanto para safranina como para algunos de los reactivos utilizados en las pruebas histoquímicas, a partir del tercio interno del primer estrato.

A partir de esta etapa se empieza a observar una línea clara en el estrato más externo del esclerénquima en empalizada.

Las células parenquimáticas continúan consumiéndose, el estrato subyacente al esclerénquima en empalizada presenta pequeños cristales de forma geométrica que no reaccionaron con la prueba de Alizarina, sin embargo, son birrefringentes bajo luz polarizada, por lo que probablemente sean de oxalato de calcio (Lámina III figs.6 y 7).

La prueba de A.P.S. fue positiva en las paredes celulares de las cuatro capas que constituyen la testa, sin embargo, la reacción fue más intensa a partir del tercio interno del primer estrato del esclerénquima en empalizada. Este mismo patrón de tinción se observó con safranina.

El Rojo de Rutenio dió reacción positiva en la subepidermis y en el esclerénquima en empalizada, evidenciando la presencia de

pectinas. Si bien la reacción no es tan intensa, presenta el patrón observado con A.P.S. y safranina.

La presencia de lípidos se observó con la prueba de Rojo O de Aceite en subepidermis y en los dos tercios externos del primer estrato del esclerénquima en empalizada.

Los taninos se presentan en epidermis y subepidermis.

Con el Cloroyoduro de Zinc se observan reacciones diferentes en la testa :

Amarillo en epidermis y subepidermis, indicando la presencia de cutina o suberina; gris en los dos tercios externos del primer estrato del esclerénquima, marcando probablemente la presencia de depósitos secundarios y azul en los estratos restantes indicando la presencia de celulosa o hemicelulosa.

La testa en la semilla madura queda formada por 4 capas celulares diferentes :

- (1) Epidermis uniestratificada transformada en tricomas
- (2) Subepidermis uniestratificada
- (3) Capa de esclerénquima en empalizada formada por 3 a 4 estratos de células alargadas en dirección perpendicular a la superficie de la semilla y de gruesas paredes
- (4) Parénquima que ha quedado reducido a una capa de paredes celulares comprimidas (Lámina III fig.8).

En esta etapa los resultados histoquímicos presentan el patrón descrito anteriormente. Sin embargo, las paredes celulares del parénquima se tiñen intensamente con A.P.S. y Rojo de Rutenio.

Esta última capa queda separada del endospermo por una

LAMINA III

Fig.1 Corte longitudinal de óvulo 1 día después de la polinización. Variedad China. 100X. Al negativo. C.C.  
Hd (Hipodermis)  
Pa (Parénquima)  
Pd (Protodermis)  
Pov (Pared del ovario)

Fig.2 Corte longitudinal de ovario. Variedad Iproved Large leaf 100X. Al negativo C.C.  
Hd (Hipodermis)  
Pa (Parénquima)  
Pd (Protodermis)

Fig.3 Corte longitudinal de semilla 10 días después de la polinización. Variedad Large leaf 100X. Al negativo. C.C.  
Alm (Almidón)  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Nu (Núcleo)  
Pa (Parénquima)  
Se (Subepidermis)  
Tr (Tricomas)

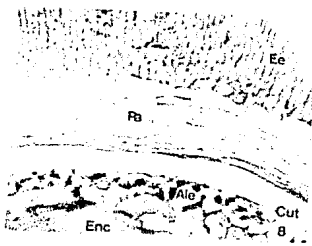
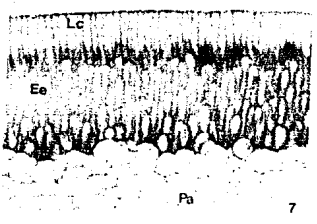
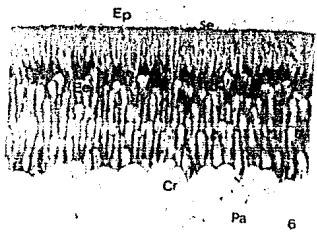
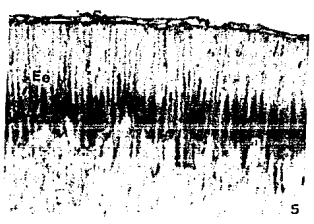
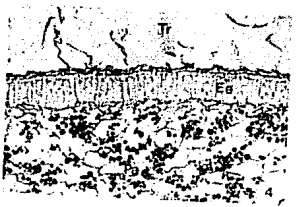
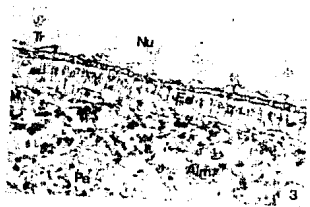
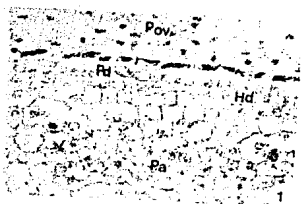
Fig.4 Corte longitudinal de semilla 15 días después de la polinización. Variedad China. 40X. Al negativo C.C.  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Pa (Parénquima)  
Se (Subepidermis)  
Tr (Tricomas)

Fig.5 Corte longitudinal de semilla 26 días después de la polinización. Variedad Improved large leaf. 102.4X. Al negativo. C.C.  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Se (Subepidermis)

Fig.6 Corte longitudinal de semilla 30 días después de la polinización. Variedad Improved large leaf. 66X. Al negativo. C.C.  
Cr (Cristales)  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Ep (Epidermis)  
Pa (Parénquima)  
Se (Subepidermis)

Fig.7 Corte longitudinal de semilla 30 días después de la polinización. Variedad China. 66X. Al negativo. C.C.  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Lc (Línea clara)  
Pa (Parénquima)

Fig.8 Corte longitudinal de semilla 50 días después de la polinización. Variedad China. 64X. Al negativo. C.C.  
Ale (Aleurona)  
Cut (Cutícula)  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Enc (Endospermo celular)  
Pa (Parénquima)



cutícula que da reacción positiva a pectinas, cutina y lípidos (Lámina III fig.8).

Hacia el extremo calazal de la semilla se observa una cámara que se origina por la formación de un septo de tejido parenquimatoso el cual lleva una ramificación del haz vascular (Lámina VI fig.1).

### (3.3) DESARROLLO DEL COJINCILLO

El tegumento en la región comprendida entre el funículo y el micrópilo, el cojincillo, (Lámina II fig.3) y la zona adyacente, tiene un desarrollo diferente al observado en la mayor parte de la semilla.

En el cojincillo, la protodermis está formada por un estrato de células rectangulares alargadas radialmente, la mayoría de estas células se han dividido anticlinal y periclinalmente para dar lugar a dos estratos de células cuadradas de pared delgada y núcleos grandes (Lámina IV fig.1).

La hipodermis es uniestratificada, las células son de forma cúbica y algunas se han dividido en el plano periclinal dando como resultado dos estratos de células pequeñas y rectangulares cuyo eje mayor es paralelo a la superficie de la semilla (Lámina IV fig.1)

Diez días después de la antesis la protodermis sufre de 2 a 3 divisiones más para dar lugar a una epidermis múltiple formada por

4 a 5 estratos de células pequeñas.

La hipodermis externa, a diferencia de lo que ocurre en el resto del tegumento, se transforma en una capa de células subepidérmicas que se dividen periclinalmente.

Las células de la hipodermis interna se han dividido periclinalmente para formar dos estratos celulares (Lámina IV fig.2)

A los 15 días, las células epidérmicas más externas se diferencian en tricomas, los tres estratos subyacentes son de forma rectangular y uno de forma redonda.

El estrato ubicado por arriba de la subepidermis se elonga en dirección perpendicular a la superficie de la semilla.

La subepidermis está formada por 2 a 3 estratos de células rectangulares alargadas radialmente.

La hipodermis interna se divide de 1 a 2 veces más para formar la capa de esclereidas que se continua con el esclerónquima en empalizada del resto de la testa (Lámina IV fig.3).

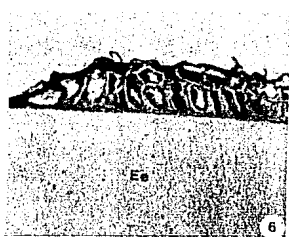
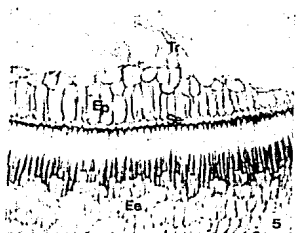
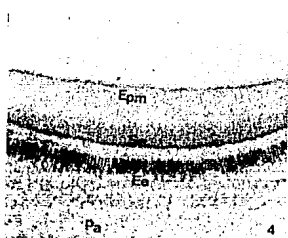
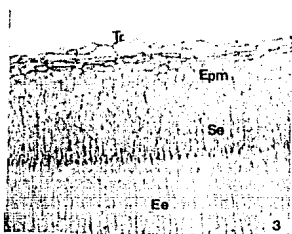
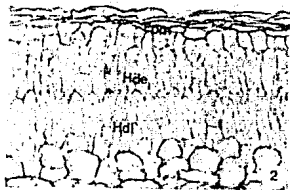
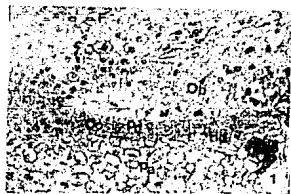
A los 20 días, el cambio más evidente es la elongación radial del estrato más interno de la epidermis (Lámina IV fig.4).

Después de los 30 días la epidermis y subepidermis del cojincillo dan reacción positiva a polisacáridos insolubles, taninos y proteínas. La prueba de Cloroyoduro de Zinc y Rojo de Rutenio fueron positivas en la epidermis múltiple evidenciando respectivamente, cutina o suberina y pectinas.



#### LAMINA IV

- Fig.1 Corte longitudinal de óvulo (acercamiento del cojincillo) 1 día después de la polinización.  
Variedad Improved large leaf.  
102.4X. Al negativo. C.C.  
Co (Cojincillo)  
F (Funiculo)  
Hd (Hipodermis)  
Ob (Obturador)  
Pa (Parénquima)  
Pd (Protodermis)
- Fig.2 Corte longitudinal de semilla 10 días después de la polinización.  
Variedad Large leaf.  
204.8X. Al negativo. C.C.  
Epm (Epidermis múltiple)  
Hde (Hipodermis externa)  
Hdi (Hipodermis interna)
- Fig.3 Corte longitudinal de semilla 15 días después de la polinización.  
Variedad Improved large leaf.  
102.4X. Al negativo. C.C.  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Epm (Epidermis múltiple)  
Se (Subepidermis)  
Tr (Tricomias)
- Fig.4 Corte longitudinal de semilla 20 días después de la polinización.  
Variedad China.  
25X. Al negativo. C.C.  
Ee (Esclerénquima en empalizada).  
Epm (Epidermis múltiple)  
Pa (Parénquima)  
Se (Subepidermis)
- Fig.5 Corte longitudinal de semilla 20 días después de la polinización (región adyacente al cojincillo).  
Variedad Improved large leaf.  
64X. Al negativo. C.C.  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Ep (Epidermis)  
Se (Subepidermis)  
Tr (Tricomias)
- Fig.6 Corte longitudinal de semilla madura deshidratada (región adyacente al cojincillo).  
Variedad Large leaf.  
50X. Al negativo. C.C.  
Ee (Esclerénquima en empalizada)  
Ep (Epidermis)  
Se (Subepidermis)



En la región adyacente al cojincillo la protodermis se divide periclinalmente y forma de 3 a 4 estratos, de los cuales el más externo se diferencia en tricomas. Esta condición se observa hasta que la semilla ha madurado. Sin embargo, las paredes celulares se han engrosado notablemente y su contenido presenta depósitos de taninos (Lámina IV figs.5 y 6).

#### (3.4) DESARROLLO DEL ENDOSPERMO

El desarrollo del endospermo corresponde al tipo nuclear.

Los núcleos libres y el citoplasma se distribuyen en el margen de la célula central, ya que una gran vacuola ocupa el centro de esta célula (Lámina V fig.1).

La formación de paredes celulares inicia en la región micropilar, diez días después de la antesis (Lámina V fig.3).

A los 20 días, el endospermo se ha celularizado totalmente; las células son grandes, de pared delgada y forma irregular, lo que en conjunto da lugar a un tejido de apariencia laxa en donde se depositan grandes reservas de almidón. Los gránulos de almidón varían en tamaño y se distribuyen básicamente en el margen del tejido (Lámina V fig.2). Las células periféricas son pequeñas y aún conservan su material nuclear.

Conforme el desarrollo avanza, el endospermo va siendo consumido por el embrión.

A los 26 días, se observan únicamente paredes celulares y

umentan las reservas de almidón, el cual se sigue distribuyendo en la periferia del tejido.

En la semilla madura casi todo el endospermo se ha consumido, quedando únicamente paredes celulares (Endospermo no celular) que se tiñen intensamente con A.P.S. y una capa de células vivas (Capa de Aleurona) formada por uno a tres estratos de células pequeñas con abundantes reservas protéicas (Lámina III fig.8).

### (3.5) DESARROLLO DEL EMBRION

La etapa más joven observada durante la embriogénesis de *I. aquatica* corresponde a la etapa de embrión globular, diez días después de la antesis (Lámina V fig.3).

Las células del embrión son pequeñas, generalmente cúbicas y de núcleos grandes.

El cuerpo del embrión está conectado, hacia la región micropilar, con un tejido amorfo, el suspensor. Las células que lo constituyen son irregulares, su núcleo es pequeño y excéntrico; las células que se continúan con el cuerpo del embrión son pequeñas, a diferencia de las ubicadas hacia la región micropilar.

A los 15 días, se observan los primordios cotiledonarios, el embrión ha crecido hasta alcanzar la etapa de corazón. El suspensor es periforme y masivo (Lámina V fig.4).

A los 20 días, se observan tres grados de desarrollo :

En la variedad *Large leaf*, aún se conserva el suspensor, el

cual presenta depósitos de almidón; el eje embrionario es pequeño y los cotiledones ya se han diferenciado (Lámina V fig.5).

En las variedades Improved large leaf y China, se observa la continuidad del procambium entre los cotiledones y el eje embrionario, los cuales se han elongado aún más (Lámina V figs. 6 y 7).

Estos diferentes grados de desarrollo corresponden a la etapa torpedo e inicia el depósito de almidón, el cual se distribuye en los cotiledones y en la base del eje embrionario. Conforme continua el desarrollo, el depósito de este polisacárido va aumentando.

A los 26 días, los cotiledones empiezan a plegarse e inicia la diferenciación de las células laticíferas:

Entre las células cotiledonarias se observan células muy pequeñas, de forma redonda, citoplasma granuloso y núcleo grande; estas células aumentan de tamaño y presentan una vacuola central.

La vacuola aumenta de volumen, de tal manera que el citoplasma y el núcleo van siendo desplazados hacia la periferia de la célula. Debido a la posición de la vacuola, el citoplasma se observa como un anillo o aro dentro de la célula y presenta escasas reservas de almidón y proteínas.

En las siguientes etapas de desarrollo, en algunos laticíferos, el "anillo" de citoplasma y el núcleo ya no se observan, ya que la vacuola ha ocupado toda la célula.

A los 30 días, el eje embrionario es muy largo y los

cotiledones han alcanzado la región calazal. Entre las células cotiledonarias se observan diferentes etapas de desarrollo de las células laticíferas, desde células con citoplasma "anillado", hasta células en donde se han perdido completamente el citoplasma y el núcleo, por lo que se consideran como células laticíferas maduras (Lámina V fig.8).

A partir de esta etapa la composición química del contenido de las células del embrión empieza a cambiar.

El material de reserva predominante sigue siendo el almidón, sin embargo, se empiezan a observar pequeños gránulos que se tixen de azul con los reactivos Azul Mercúrico de Bromofenol y Azul Negro de Naftol, lo que indica la presencia de proteínas. A los 50 días ésta constituye la principal molécula de reserva, el almidón ha sido prácticamente consumido.

La presencia de taninos se evidenció únicamente con el Sulfato Férrico en el contenido de las células epidérmicas de los cotiledones (Lámina V fig.9).

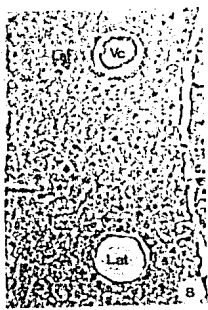
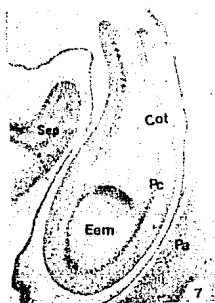
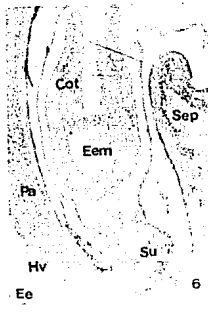
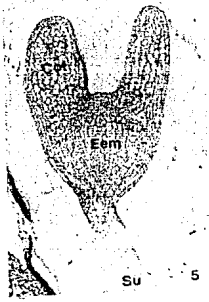
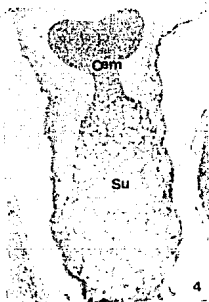
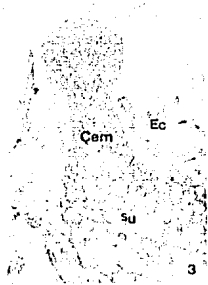
La semilla madura deshidratada presenta un embrión de color crema que ocupa la mayor parte de la semilla.

Cada cotiledón es bilobado, presenta numerosas células laticíferas y su plegamiento corresponde al tipo longiplicado (Lámina VI fig.2).

En las figuras 1, 2 y 3 se resumen los cambios histoquímicos que se llevan a cabo durante el desarrollo de la semilla. Las reacciones ocurren básicamente en las paredes celulares, sin embargo, únicamente en la región adyacente al cojincillo el

LAMINA V

- Fig.1 Corte longitudinal de semilla 10 días después de la polinización. Variedad Large leaf 100X. Al negativo. C.C. En (Endospermo nuclear) Nu (Núcleo) S (Saco embrionario)
- Fig.2 Corte longitudinal de semilla 18 días después de la polinización. Variedad Large leaf. 64X. Al negativo. Contraste de fases. Alm (Almidón) Ec (Endospermo celular)
- Fig.3 Corte longitudinal de embrión 10 días después de la polinización. Variedad Large leaf. 52.8X. Al negativo. C.C. Cem (Cuerpo del embrión) Ec (Endospermo celular) Su (Suspensor)
- Fig.4 Corte longitudinal de embrión 15 días después de la polinización. Variedad Large leaf. 33X. Al negativo. C.C. Cem (Cuerpo del embrión) Su (Suspensor)
- Fig.5 Corte longitudinal de embrión 20 días después de la polinización. Variedad Large leaf. 33X. Al negativo. C.C. Cot (Cotiledones) Eem (Eje embrionario) Su (Suspensor)
- Fig.6 Corte longitudinal de embrión 20 días después de la polinización. Variedad China 13.2X. Al negativo. C.C. Cot (Cotiledones) Ee (Esclerenquima empalizada) Eem (Eje embrionario) Hv (Haz vascular) Pa (Parénquima) Sep (Septo) Su (Suspensor)
- Fig.7 Corte longitudinal de embrión 20 días después de la polinización. Variedad Improved large leaf. 13.2X. Al negativo C.C. Cot (Cotiledones) Eem (Eje embrionario) Pa (Parénquima) Pc (Procambium) Sep (Septo)
- Fig.8 Corte longitudinal de cotiledón 35 días después de la polinización. Variedad China 102.4X Al negativo C.C. Cot (Cotiledón) Lat (Laticífero) Vc (Vacuola)
- Fig.9 Corte longitudinal de cotiledón de embrión maduro. Variedad Large leaf 100X. Al negativo C.C. Cot (Cotiledón) Ep (Epidermis) Tan (Taninos)





LAMINA VI

Fig.1 Morfología interna de la semilla madura deshidratada.

M.E.B. 240X.

Cam (Cámara)

Cot (Cotiledón)

Eem (Eje embrionario)

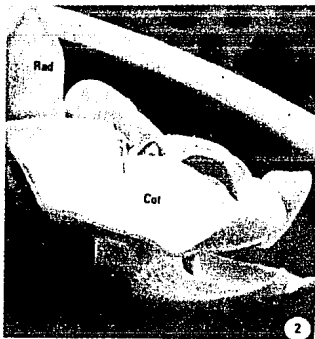
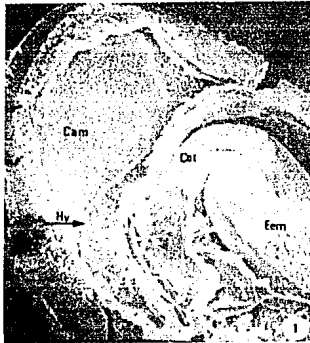
Hv (Haz vascular)

Fig.2 Embrión de una semilla madura deshidratada.

M.E.B. 180X.

Cot (Cotiledón)

Rad (Radícula)




contenido de las células epidérmicas reacciona positivamente al Cloruro Férrico, indicando la presencia de taninos.


La prueba para proteínas fue positiva en los núcleos de la epidermis y subepidermis de los 10 a los 15 días después de la polinización, y en el esclerénquima en empalizada de los 10 a los 25 días después de la polinización. Esta prueba también fue positiva en el lumen celular de las esclereidas y de la epidermis múltiple del cojincillo en las últimas etapas de desarrollo.


En la figura 3 se presenta la relación existente entre la embriogénesis y el desarrollo del endospermo. Durante estos eventos, el A.P.S. reacciona en las paredes celulares del embrión y del endospermo. Aún cuando el Cloroyoduro de Zinc no es una prueba específica para el almidón, éste se observó durante el desarrollo del embrión, desde la etapa 20 hasta 45 días después de la polinización. En el endospermo también se depositó almidón durante el desarrollo de la semilla; el polisacárido se empezó a evidenciar desde etapas muy jóvenes hasta 45 días después de la polinización, posteriormente sólo se observó en las células de aleurona junto con proteínas.


**SIMBOLOGIA CORRESPONDIENTE A LAS FIGURAS 1, 2 Y 3 :**

A.P.S = Acido Peryódico Reactivo de Schiff  
A.M.B. = Azul Mercúrico de Bromofenol  
R.O.A. = Rojo "O" de Aceite  
P.P. = Permanganato de Potasio  
C.Z. = Cloroyoduro de Zinc

 = Polisacáridos insolubles

 = Proteínas

 = Taninos

 = Lípidos

 = Celulosa y Hemicelulosa

 = Cutina y suberina

En las semillas maduras deshidratadas se aplicó Cloruro Férrico y Sulfato Férrico para detectar Taninos.

A partir de los 30 días después de la polinización se aplicó Azul Negro de Naftol para evidenciar Proteínas.

Figura 1: HISTOQUIMICA DE LA EPIDERMIS Y SUBEPIDERMIS DE LA TESTA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE *I. aquatica*.

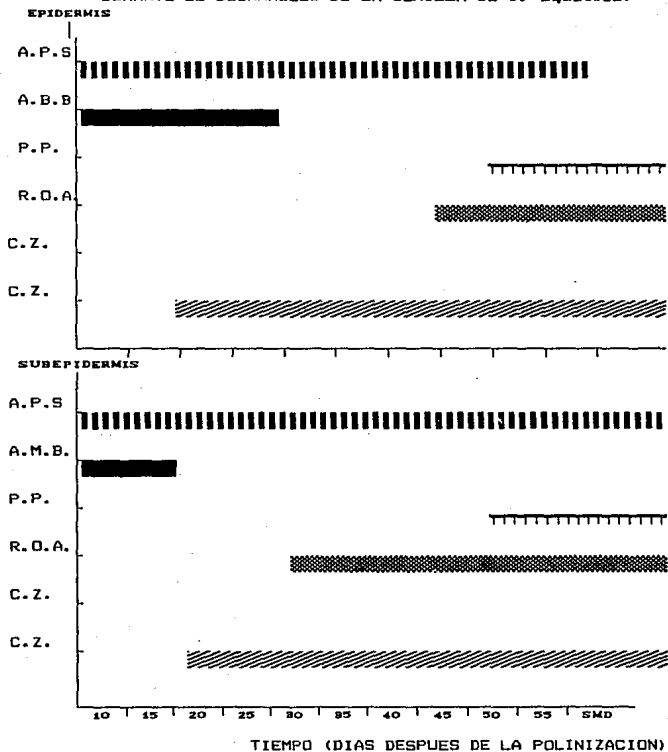


Figura 2: HISTOQUIMICA DEL ESCLERENQUIMA EN EMPALIZADA Y DEL PARENQUIMA DE LA TESTA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE *J. aquatica*

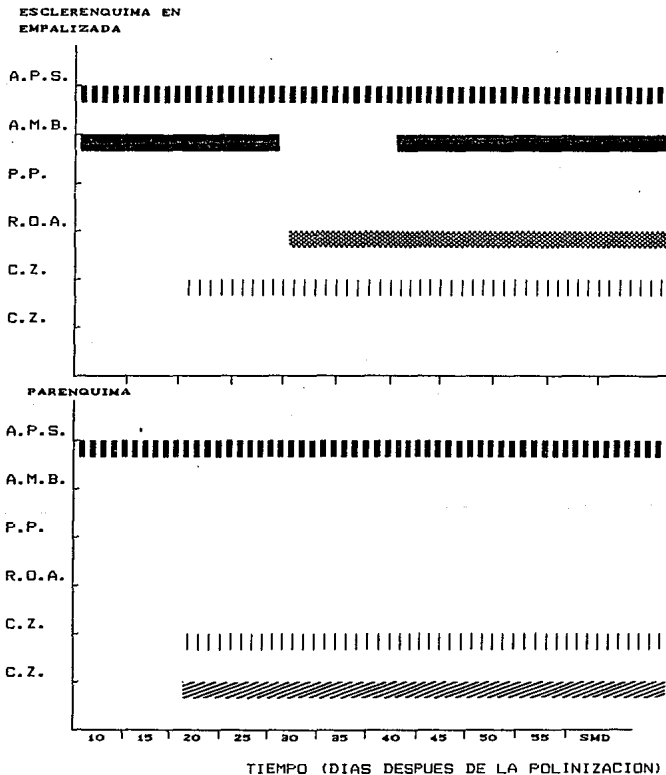


Figura 3: HISTOQUIMICA DEL COJINCILLO DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE *I. aquatica*.

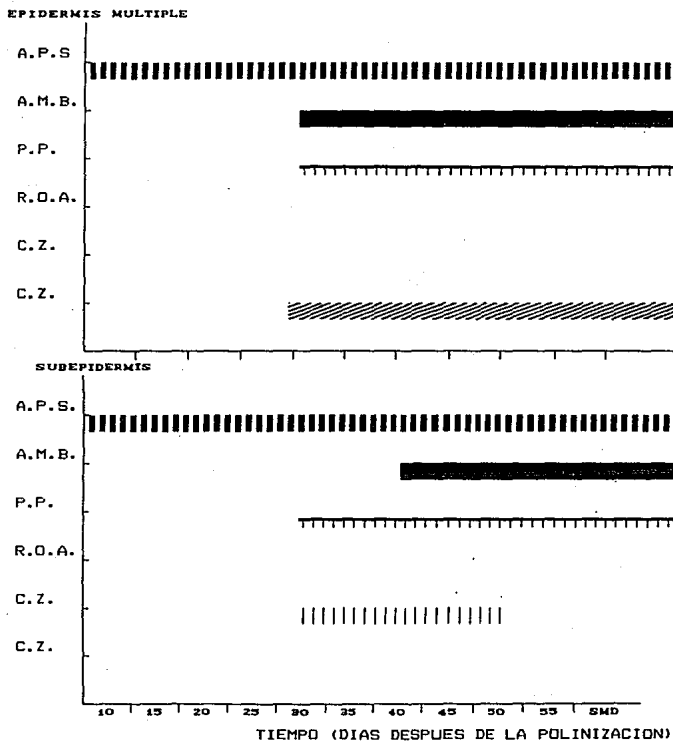


Figura 4 : HISTOQUIMICA DEL DESARROLLO DEL EMBRION Y ENDOSPERMO DE  
*I. aquatica*.

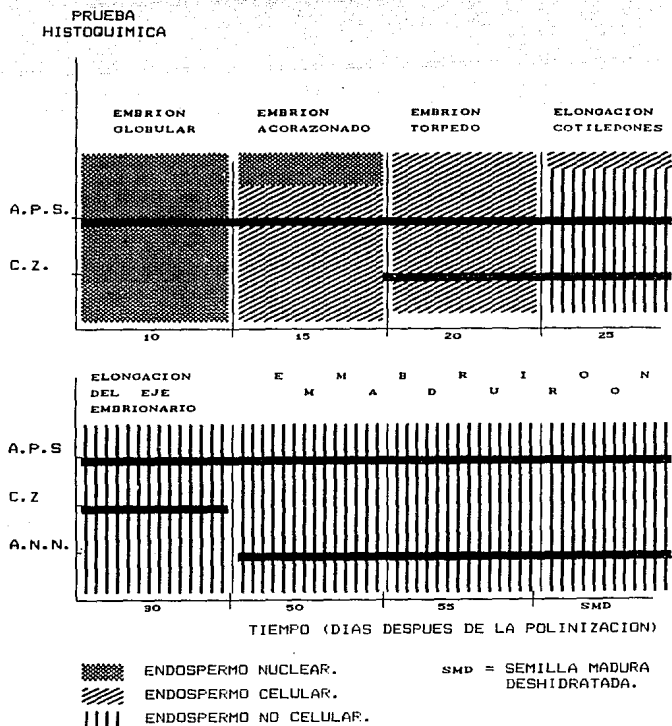




Tabla 3: TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA REGISTRADAS EN EL INVERNADERO DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO.

M E S	TEMPERATURA °C		HUMEDAD %	
	MAX.	MIN.	MAX.	MIN.
OCTUBRE	29.4	15.39	87.28	47.42
NOVIEMBRE	28.8	12.55	80.62	45.19
DICIEMBRE	28.36	10.95	76.28	40.64
ENERO	29.12	13.17	78.21	44.35
FEBRERO	28.58	13.93	89.13	43.49

## VI DISCUSION

### (1) MORFOLOGIA EXTERNA

Se han registrado gran número de cultivares de *I. aquatica*, señalando que la diferencia entre ellos radica en la forma y tamaño de las hojas y en el color de los tallos y las flores.

De acuerdo con Rubertó y Martin (1975) la diferencia más importante es la que existe en las formas de cultivo. Por otro lado, Yamaguchi (1983) relaciona el tipo de cultivo con la forma de la hoja : "Chiang Quat" (hoja angosta) es el tipo de cultivar adaptado para condiciones de secano, mientras que el de hoja ancha, "Pak Quat", es mejor para el cultivo de inundación.

Considerando la morfología vegetativa, no se observaron diferencias entre las variedades estudiadas. La temperatura y humedad relativa se mantuvieron constantes durante el periodo de muestreo (Tabla 3); probablemente, bajo estas condiciones no se exprese el fenotipo que nos permitiría diferenciarlas o bien, se trata de una misma variedad.

Se detectaron diferencias pero relacionadas con la producción de flores y frutos, siendo la variedad Improved large leaf la que presentó mayor producción.

De acuerdo con Pérez (1990), existen diferencias fisiológicas entre las variedades Large leaf, Improved large leaf y China. Sin embargo, estas diferencias, así como las propuestas por otros autores (Tisbe y Cadiz, 1967; Edie, 1969; Herklots, 1977; Yamaguchi, 1983 y Tiwari y Chandra, 1985) pueden ser modificadas por

factores ambientales.

El desarrollo de la semilla, en las tres variedades, fué de 55 días; de acuerdo con Cornelis, et al (1985) y Pérez (com. pers.) la ontogenia de la semilla de *I. aquatica* es de aproximadamente 35 días. Esta diferencia puede atribuirse a las condiciones bajo las cuales se encontraban las plantas antes y durante la floración, así como durante el desarrollo y maduración de la semilla.

Probablemente este periodo se prolongó por : la edad de las plantas y/o por la aplicación de fertilizantes y plaguicidas.

## (2) ANATOMIA

El ovario, en los distintos géneros de la familia Convolvulaceae, es sincárpico; sin embargo, el número de carpelos que lo forman es variable.

Se ha observado que el ovario de *Ipomoea rubrocaerulea* (Woodcock,1942), *Ipomoea sinuta*, *Ipomoea carnea* (Kaur y Singh,1970), *Turbina corymbosa* (Márquez,1986) y *Dichondra sericea* (Gutiérrez,1990) está formado por 2 carpelos; por 2 a 3 en *Convolvulus arvensis* (Sripleng y Smith,1960), *Rivea hypocrateriformis* e *Ipomoea purpurea* (Govil,1971); por 3 en *I. purpurea* (Ponce,1990); por 3 a 4 en *Ipomoea pestigridis* e *I. aquatica* (Jos,1963) y por 4 carpelos en *I. x leucantha* (López-Curto,1990). En este trabajo se encontró que el ovario de *I. aquatica* está formado por 2 carpelos; tales resultados no

coinciden con las observaciones realizadas por Jos (1963), quien señala que el ovario está formado por 3 a 4 carpelos. Tal discrepancia puede atribuirse al nivel del corte, ya que se han observado falsos septos que en algunos casos llegan a dividir al ovario (Wilson, 1960 En: López-Curto, 1987).

Como en todas las especies estudiadas, el óvulo de *I. aquatica* es anátropo, unitégmico y funiculado. Datta y Biswas (1970) registraron que el óvulo de *I. aquatica* es bitégmico, sin embargo, el trabajo carece de un estudio ontogenético que apoye tales observaciones.

El saco embrionario es recto y angosto y, al igual que el canal micropilar, se encuentra rodeado por numerosos gránulos de almidón. La presencia de este carbohidrato se ha observado en otras especies de la familia (Márquez, com. pers.)

Existen discrepancias sobre la presencia de células parietales en los diferentes géneros de la familia (Dahlgren, 1927; Marthur, 1934 En : Sripleng y Smith, 1960; Márquez, 1986). Sin embargo, en varias especies se ha caracterizado al óvulo como crasinucelado : *Ipomoea leari*, *Jacquemontia violaceae*, *Ipomoea pulchella*, *Ipomoea horsfalliae*, *Ipomoea obscura*, *Ipomoea sepiaria*, *Operculina turpethum*, *I. sinuta*, *I. purpurea*, *I. carnea* (Rao, 1940; Rao, 1944 En: Márquez, 1986) y en *T. corymbosa* (Márquez, 1986)

Sampathkumar y Ayyangar (1982) observaron que los óvulos de 33 especies de la familia son generalmente crasinucelados, pero no señalan cuántas y cuáles son las especies que presentan esta característica.

Jos (1963), observó que *I. aquatica* presenta un óvulo

tenuinucelado, pero en este trabajo se observó claramente que la célula madre de la megaspora tiene una posición subhipodérmica, por lo que se le considera como crasinucelado.

En la mayoría de los óvulos de la familia Convolvulaceae el haz vascular se extiende más allá de la calaza, casi hasta el micrópilo. *D. sericea* (Gutiérrez,1990) y *Evolvulus alsinoides* (Tiagi y Gupta,1963 En: Gutiérrez,1990) son las excepciones, ya que el haz vascular penetra por el funículo, recorre la rafe y finaliza en la región calazal.

De acuerdo con Corner, 1976 En: Gutiérrez, 1990, el haz vascular no se ramifica, sin embargo varios autores han encontrado ramificaciones dentro del óvulo (Sripleng y Smith,1960; Murguía 1986; López-Curto,1987). En *I. aquatica* el haz vascular también se ramifica, tal ramificación se observa en el septo parenquimatoso que forma la cámara calazal.

El hecho de que en las Gimnospermas el haz vascular presente ramificaciones, su presencia en Angiospermas se ha considerado como un carácter primitivo, sin embargo, este carácter se presenta tanto en familias consideradas primitivas como avanzadas.

La testa de *I. aquatica* está constituida por una epidermis y subepidermis uniestratificadas, un esclerénquima en empalizada formado por 3 a 4 estratos celulares y una capa de células parenquimáticas cuyo número de estratos disminuye conforme avanza el desarrollo. De acuerdo con Márquez (1986) este patrón estructural se ha observado en todas las semillas estudiadas, por lo que se considera como un carácter diagnóstico de la familia

## Convolvulaceae.

Las especies de la familia presentan una epidermis que puede diferenciarse o no en tricomas.

Jos (1963) y Sampathkumar et al. (1982) reportan la presencia de estas estructuras en la semilla de *I. aquatica*, lo que coincide con las observaciones realizadas en este trabajo.

Márquez (1986) menciona que las células epidérmicas de la testa de las Convolvuláceas carecen de almidón, por lo que se considera como una característica que permite diferenciarlas de la familia Cuscutaceae. En *D. sericea* e *I. aquatica*, se observaron pequeños granos de almidón únicamente en la epidermis de las semillas inmaduras.

La forma de las células subepidérmicas varía en los diferentes géneros. En *I. aquatica*, al igual que en *C. arvensis* (Sripleng y Smith, 1960), *Ipomoea pauciflora*, *Ipomoea murucoides* (Murguía, 1986), *I. purpurea* (Ponce, 1990) e *I. x leucantha* (López-Curto, 1990) estas células son de forma rectangular y su eje mayor es paralelo a la superficie de la semilla. En *T. corymbosa* (Márquez, 1986), *Ipomoea hispida* y en *Volvulopsis nummularia* (Kaur y Singh, 1987), el eje mayor es perpendicular a la superficie. Gutierrez (1990) observó que la subepidermis de *D. sericea*, a diferencia de las especies estudiadas, está formada por células que se elongan radial y tangencialmente.

El número de estratos celulares que forman la capa del esclerónquima en empalizada también es variable; sin embargo, éste se conserva constante en individuos de la misma especie (Márquez, 1986).

Se han registrado de 1 a 2 estratos en *V. nummularia* y en *Jacquemontia tamnifolia* (Kaur y Singh, 1987); 2 estratos en *Ipomoea angulata*, *Ipomoea coccinea*, *I. hispida* (Kaur y Singh, 1987) y en *D. sericea* (Gutiérrez, 1990); 2 a 3 en *R. hypocrateriformis* (Govil, 1971), *Ipomoea ramosi* (Kaur y Singh, 1987), *T. corymbosa* (Márquez, 1986) e *I. purpurea* (Ponce, 1990); 2 a 4 en *I. murucoides* e *I. pauciflora* (Murguía, 1986); 3 en *I. tenuipes*, *I. angustifolia* y en *Mina lobata* (Kaur y Singh, 1987) y de 3 a 4 en *I. x leucantha* (López-Curto, 1990).

En todas estas especies el primer estrato de esclereidas es de mayor longitud y presenta una (*I. purpurea*, *D. sericea*, *C. arvensis*) o dos líneas claras (*I. x leucantha*, *I. murucoides* e *I. pauciflora*).

Sripleng y Smith (1960) señalan que el esclerénquima en empalizada puede estar formado por 2 o más estratos, sin embargo, esto no afecta la posición de la línea clara.

Jos (1963) reportó que la semilla madura de *I. aquatica* presenta un esclerénquima en empalizada formado por 2 a 3 estratos. En este trabajo se observaron de 3 a 4 estratos celulares además de la presencia de una línea clara en el estrato adyacente a la subepidermis. Esta discrepancia puede atribuirse al nivel y al plano del corte; a que los cortes en los cuales se basó la descripción, corresponden a distintas regiones de la semilla o bien, que las observaciones de Jos se hicieron en semillas que no habían alcanzado la madurez.

En la mayoría de las semillas estudiadas se ha observado almidón en las células que forman la capa parenquimatosa; cuando

la semilla ha madurado el almidón ya no se observa y el parénquima queda reducido a una capa de paredes celulares comprimidas. Esto mismo se observó durante el desarrollo de la semilla de *I. aquatica*; sin embargo, a diferencia de las especies estudiadas hasta ahora, el primer estrato de células parenquimáticas presenta pequeños cristales de forma geométrica, los cuales se empiezan a observar a partir de los 10 días después de que se polinizaron las flores. Jos (1963) no registró la presencia de estos cristales.

La presencia de una pequeña cámara en la semilla de *I. aquatica* no se ha observado en otras especies de la familia y posiblemente tenga relación con su hábito acuático.

Márquez (1986) señala que existen discrepancias en cuanto al origen del cojincillo.

En *I. aquatica* la epidermis y subepidermis participan en la formación del cojincillo; lo cual coincide con las observaciones realizadas por Jos (1963). En *R. hypocrateriformis* (Govil, 1971), *T. corymbosa* (Márquez, 1986), *I. murucoides*, *I. pauciflora* (Murguía, 1986) e *I. x leucantha* (López-Curto, 1987) el cojincillo se origina por divisiones de las células epi e hipodérmicas.

Aún cuando existen discrepancias sobre la participación de la subepidermis en la formación del cojincillo, Márquez (1986) menciona que parece ser general que el cojincillo es de origen epidérmico y que las células de la subepidermis no forman la capa del esclerénquima en empalizada, ésta es producto de la epidermis.



El desarrollo del endospermo de *I. aquatica* corresponde al tipo nuclear, igual que en las especies estudiadas hasta ahora. La formación de paredes celulares inicia en la región micropilar, cuando el embrión se encuentra en la etapa globular; estas observaciones coinciden con las realizadas por Sripileng y Smith (1960) en *C. arvensis* y Kaur y Singh (1987) en *I. angulata*.

No se observó la primera división del cigoto; sin embargo, Jos (1963) reportó que ésta es transversal. De las dos células resultantes, la célula apical se divide transversalmente y forma el cuerpo del embrión, mientras que la célula basal se desarrolla en el suspensor. De acuerdo con estas observaciones, este autor concluyó que la embriogénesis de *I. aquatica* corresponde al tipo Cariofilado variación Fumaria. De igual manera, Kaur y Singh (1970,1987), consideraron que el desarrollo embrionario de *V. nummularia*, *J. tamnifolia*, *I. angustifolia*, *I. angulata*, *I. coccinea*, *I. hispida*, *I. gracilis*, *I. tenuipes*, *I. ramoni*, *M. lobata*, *I. sinuta* e *I. carnea*, queda incluido en el tipo Cariofilado.

Tomando en cuenta los tipos de embriogénesis propuestos por Maheswari, en el tipo Cariofilado la célula basal no sufre divisiones y si el suspensor está presente, siempre se deriva de la célula apical, lo cual no coincide con las descripciones realizadas por Jos, Kaur y Singh.

Si la célula basal se divide y diferencia en el suspensor y la célula apical se divide transversalmente para formar el cuerpo del embrión, entonces el tipo de embriogénesis observada por

Jos, Kaur y Singh correspondería al tipo Solanado.

El embrión de *I. aquatica*, al igual que el de otras especies, ocupa la mayor parte de la semilla; los cotiledones se elongan considerablemente, son bilobados y plegados.

Austin, 1973 En: Gutiérrez, 1990 "señala que los embriones de varios géneros de la familia presentan dos direcciones básicas de plegamiento, las cuales se mantienen constantes entre los géneros".

*I. aquatica* presenta un tipo de plegamiento que corresponde al longiplicado, al igual que *I. purpurea* y *T. corymbosa*.

Entre las células cotiledonarias se observaron células de mayor tamaño que corresponden a las células laticíferas; éstas también se han observado en otras especies como *I. murucoides*, *I. pauciflora* (Murguía, 1986), *I. x leucantha* (López-Curto, 1990) e *I. purpurea* (Alva et al, 1990).

### (3) HISTOQUIMICA

En la semilla madura, las paredes celulares de la subepidermis presentan cutina o suberina, pectina, taninos y lípidos. Esta composición varía en las diferentes especies; hasta el momento únicamente se ha reportado lignina en *C. arvensis*.

Cada uno de los estratos que forman la capa del esclerénquima en empalizada presentan una composición determinada, que varía también en las diferentes especies.

En *I. aquatica* las paredes celulares del primer estrato presentan lípidos y un tipo de depósitos que se tiñen de color gris con la prueba de Cloroyoduro de Zinc; es importante señalar que esta región reacciona débilmente con A.P.S. y safranina. Márquez (1986) y Murguía (1986) reportaron un patrón de tinción semejante en *T. corymbosa* e *I. muruoides* respectivamente, con el A.P.S.

Para otras especies se ha observado la presencia de taninos por encima de la línea clara (*I. purpurea*, *T. corymbosa*).

Los estratos internos del esclerénquima presentan lípidos, pectinas y celulosa o hemicelulosa.

El esclerénquima en empalizada de *I. rubrocaerulea* presenta suberina; Juliano, 1935 En: Sripleng y Smith, 1960 señala que el esclerénquima de *I. batatas* es lignificado; en *D. sericea* se observaron depósitos de cutina o suberina.

La capa de células parenquimáticas presenta depósitos de pectinas, que hasta el momento no se habían registrado en las especies estudiadas.

La cutícula que separa la testa del endospermo es de naturaleza lipóide, lo cual coincide con los resultados obtenidos en *T. corymbosa*, *C. arvensis*, *I. x leucantha*, *D. sericea*, *I. muruoides*, *I. pauciflora* e *I. purpurea*. En *I. aquatica* reacciona además, con Rojo de Rutenio evidenciando pectinas. Gutiérrez (1990) observó que esta cutícula presenta polisacáridos insolubles.

Márquez (1986) señala que las paredes celulares del endospermo de *T. corymbosa* presentan una débil reacción al A.P.S. Brechú

(1984) reportó que están constituidas por un galactomanano. En *I. aquatica* las paredes del endospermo presentan una fuerte reacción a polisacáridos insolubles.

El embrión de *I. aquatica* presentó almidón durante todo su desarrollo. Aproximadamente 45 días después de la antesis aún se conservan numerosos gránulos en el eje embrionario y en los cotiledones. Sin embargo, en la semilla madura deshidratada el embrión presenta proteínas como principal sustancia de reserva.

A diferencia de *I. aquatica*, el embrión de *T. corymbosa* presenta lípidos y proteínas, éstas se observaron durante todo el desarrollo y únicamente antes de la madurez se detectó almidón en los cotiledones.

En *I. aquatica* el embrión reaccionó positivamente con la prueba de Permanganato de Potasio, evidenciando la presencia de taninos; sin embargo, esta prueba no es concluyente, ya que reacciona también con carbohidratos y otros compuestos susceptibles a la oxidación.

La presencia de taninos se confirmó con Cloruro Férrico únicamente en las células epidérmicas de los cotiledones y probablemente estén asociados con algún mecanismo de defensa.

A diferencia de *I. aquatica* y *T. corymbosa*, el embrión de *C. arvensis* está completamente lleno de almidón .

La prueba de Fluoroglucina fue positiva únicamente en el haz vascular.

Se observó que el almidón constituye la principal molécula de reserva durante el desarrollo de la semilla de *I. aquatica*; lo cual coincide con los resultados obtenidos en *T. corymbosa*, *D.*

*sericea*, *Ipomoea nil* (Becerril, 1992), *I. purpurea* (Becerril, 1991; Díaz, 1992) y en muchas especies pertenecientes al género *Ipomoea*. Sin embargo, en *I. purpurea*, a diferencia de lo observado en *I. aquatica*, el almidón se almacena únicamente en el parénquima del tegumento; ni en el embrión ni en el endospermo se deposita este polisacárido (Díaz, 1992).

En *I. aquatica*, el almidón se deposita en el parénquima de un óvulo en anthesis; tras la fecundación va siendo utilizado para mantener el desarrollo de la semilla, ya sea proporcionando energía o bien, los esqueletos de carbono para la síntesis de otros carbohidratos y/o proteínas. Conforme avanza el desarrollo el contenido de almidón en las células parenquimáticas va disminuyendo, hasta que la reacción llega a ser negativa (30 a 35 días después de la polinización). Probablemente esta molécula fue translocada al endospermo, ya que a partir de estos días el almidón fue más abundante en este tejido.

Debido a que no se encontraron diferencias estructurales ni histoquímicas durante el desarrollo de la semilla de las variedades estudiadas, se propone que no hay datos para considerarlas como variedades distintas.

#### (4) IMPERMEABILIDAD

*J. aquatica*, al igual que otras especies de la familia, posee semillas duras o impermeables al agua.

De acuerdo con los resultados de las pruebas de germinación que realizaron Datta y Biswas (1970), la latencia de las semillas de *J. aquatica* estaría dada por la testa, y no por el embrión, como ellos lo propusieron.

Se considera que algunos compuestos como cutina, suberina, lignina, taninos y lípidos constituyen una barrera para la entrada de agua a la semilla.

De acuerdo con los resultados estructurales e histoquímicos obtenidos en este trabajo, es probable que la subepidermis, el esclerénquima empalizada, el parénquima y la cutícula que separa la testa del endospermo, estén relacionados con la impermeabilidad al agua.

La subepidermis por sus gruesas paredes y por los depósitos de lípidos, cutina o suberina, pectina y taninos. El esclerénquima empalizada por la presencia de lípidos y pectinas en sus gruesas paredes y por la presencia de la línea clara, la cual se ha asociado con las semillas duras (Coe y Martin, 1920 En: Watson 1948; Barton, 1947, 1965 En: Mckee, 1977).

El parénquima podría constituir una barrera al paso de agua, ya que las paredes celulares reaccionaron intensamente con el Rojo de Rutenio evidenciando pectinas. Finalmente, la cutícula que separa la testa del endospermo también se asocia con la impermeabilidad, ya que presenta pectinas, lípidos y cutina o

suberina.

Al comparar los resultados histoquímicos con los obtenidos en otras especies, se observa que hay diferencias en la composición, aún cuando todas sean semillas duras; probablemente estas diferencias reflejen el grado de dureza de cada semilla o bien, que la estructura y composición de una de las capas de la testa tenga una influencia determinante en la entrada de agua y que esta capa varíe en las diferentes especies. La presencia de taninos en el esclerénquima en empalizada se ha registrado en *T. corymbosa* e *I. purpurea*, sin embargo, estos compuestos no se depositan en el esclerénquima de *I. aquatica*, y también es una semilla dura.

Por otro lado, el esclerénquima de *T. corymbosa* e *I. purpurea* reacciona únicamente a taninos y polisacáridos insolubles, mientras que en *I. aquatica*, además de dar reacción positiva a polisacáridos insolubles, reacciona a lípidos y a un tipo de depósito secundario cuya reacción no se ha reportado hasta el momento y que probablemente tenga relación con la dureza de la semilla.

De acuerdo con estudios ontogenéticos se ha observado que la impermeabilidad al agua ocurre durante las etapas tardías de desarrollo (Bagoury y Niyazi, 1973 En: Rolston, 1978).

En este estudio se observó que el engrosamiento de las paredes celulares de la subepidermis y del esclerénquima en empalizada ocurre aproximadamente 30 días después de la polinización. En este tiempo también se hace evidente la línea clara. El depósito de las sustancias asociadas con la dureza de la semilla inicia 20 días después de la polinización.

Probablemente, tanto la estructura como la composición química de las células de la testa desempeñan un papel importante en la impermeabilidad al agua.

¿En qué momento de la ontogenia de la semilla de *I. aquatica* la testa se torna impermeable al agua? ¿Cuál o cuáles son las capas de la testa que constituyen la barrera a la entrada de agua? ¿Tiene relación este fenómeno con los bajos porcentajes de germinación de las semillas?

Son preguntas que aún no tienen respuesta y en cuya dirección se pueden encaminar futuras investigaciones.



## VII CONCLUSIONES

- (1) No existen diferencias en la morfología vegetativa de las tres variedades de *J. aquatica*.
- (2) No existen diferencias estructurales ni histoquímicas durante el desarrollo de la semilla de las tres variedades.
- (3) El óvulo es anátropo, unitégmico, crasinucelado y funiculado.
- (4) El haz vascular penetra por el funículo, alcanza la cálaza y desciende por la antirrafe finalizando muy cerca del micrópilo.
- (5) El haz vascular se ramifica en el septo parenquimatoso que forma la cámara calazal.
- (6) La testa está formada por una epidermis diferenciada en tricomas, una subepidermis uniestratificada, un esclerénquima en empalizada de 3 a 4 estratos celulares y un parénquima de paredes celulares comprimidas.
- (7) El primer estrato del esclerénquima presenta una línea clara.
- (8) El primer estrato celular del tejido parenquimatoso de la testa se distingue del de otras especies de la familia por presentar cristales.
- (9) La epidermis y subepidermis participan en la formación del cojincillo.
- (10) La principal sustancia de reserva durante el desarrollo de la semilla es el almidón que se deposita en el parénquima, en el endospermo y en el embrión.
- (11) Las proteínas constituyen la principal molécula de reserva en el embrión de una semilla madura deshidratada.

- (12) El plegamiento del embrión es longiplicado.
- (13) Los cotiledones, en la semilla madura, presentan laticíferos y sus células epidérmicas depósitos de taninos.
- (14) El desarrollo del endospermo es de tipo nuclear.
- (15) A partir de los 20 días después de la polinización inicia el depósito de las sustancias que se asocian con la impermeabilidad al agua.
- (16) La estructura e histoquímica de la cubierta seminal indican que hay 4 sitios que se pueden relacionar con la impermeabilidad al agua:
- (a) La subepidermis de gruesas paredes que presenta depósitos de lípidos, cutina o suberina, taninos y pectinas.
  - (b) El esclerénquima en empalizada de gruesas paredes por su reacción a lípidos y pectinas y por la presencia de la línea clara.
  - (c) El parénquima por formar una capa de restos de paredes celulares con depósitos de pectina.
  - (d) La cutícula que separa la testa del endospermo por presentar lípidos, pectinas y cutina o suberina.
- (17) La semilla de *Ipomoea aquatica* presenta una cámara hacia el extremo calazal que no se ha observado en las especies de la familia hasta ahora estudiadas.

## VIII BIBLIOGRAFIA

- \* Allison, R.K., et al. (1986). The transition from seed Development to Germination: A key Role for Desiccation? Hort Science 21(5):1113-1118.
- \* R. Alva, J. Márquez Guzmán, A. Martínez Mena y E.M. Engleman. (1990). Laticifers in the embryo of *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae). Phytomorphology 40(1 y 2):125-129.
- \* Becerril, Y.H.M. (1991). Determinación del comportamiento del almidón durante el desarrollo de semillas de la familia Convolvulaceae desde antesis hasta semilla madura deshidratada y durante las primeras fases de germinación Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 136 p.
- \* Bevilacqua, R.; Roti-Michelozzi and Serrato-Valenti. (1985). Barriers to water penetration in *Cercis siliquastrum* seeds. Seed Sci. and Technol. 13:175-182.
- \* Bhojwani, S.S. and S.P. Bhatnagar. (1981). The Embriology of Angiosperms. Vikas Publishing House PVT. LTD. Delhi.
- \* Bidwell. (1979). Fisiología Vegetal. AGT Editor, México. 784 p.
- \* Brechú, F.A.E.; Márquez, G.J. y Laguna, H.G. (1984) Cambios en el endospermo durante la germinación de la semilla de *Turbina corymbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae. Phytomorphology 44(2) : 95-100.

- \* Connor, M. (1963). From composition of foods. Agriculture Handbook. Gil Friend.
- \* Cornelis, J.; J.A. Nugteren and E. Westphal. (1985). KangKong (*Ipomoea aquatica* Forsk): an important leaf vegetable in Southeast Asia. Abstracts on Tropical Agriculture. 10(4):9-21.
- \* Cronquist, A. (1988). The Evolution and Classification of Flowering Plants. Allen Press. USA. 555 p.
- \* Curtis, P.J. (1986). Microtecnia vegetal. Trillas, México. 106 p.
- \* Datta, S.C. and A.K. Banerjee. (1978). Useful weeds of west Bengal rice fields. Economic Botany 32(3):297-310.
- \* Datta, S.C. and K.K. Biswas. (1970). Germination regulating mechanisms in aquatic angiosperms. Part I *Ipomoea aquatica* Forsk. Broteria Ser. Cienc. Nat. 39(3-4):175-185.
- \* Díaz, P.D.M. (1992). Catabolismo del almidón durante el desarrollo de la semilla de *Ipomoea purpurea*, arvensis del maíz. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 99p.
- \* Edie, H.H. and B.W.C., Ho. (1969). *Ipomoea aquatica* as a vegetable crop in Hong Kong. Economic Botany 23(1):32-36.
- \* Esau, K. (1987). Anatomía de las plantas con semilla. Hemisferio Sur, Uruguay. 512 p.

- \* Govil, C.M. (1971). Morphological studies in the family Convolvulaceae. I Development and Structure of the seed coat. J. Indian bot. Soc. 50:32-39.
- \* Gutiérrez, A.M. (1990). Anatomía e Histoquímica del desarrollo de la semilla de *Dichondra sericea* Sw. (Convolvulaceae). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 82 p.
- \* Herklots, G.A.C. (1977). Vegetables in Southeast Asia. Hafner Press. Div. Macmillan Pub. Co., Inc. New York.
- \* Jensen, W.A. (1962). Botanical Histochemistry: principles and practice. WH Freeman and Co. San Francisco.
- \* Johansen, D.A. (1940). Plant microtechnique. McGraw Hill. New York.
- \* Jos, J.S. (1963). The Structure and Development of seeds in Convolvulaceae : *Ipomoea* species. Agra. University Journal of Research. 12:247-260.
- \* Kaur, H. and R.P. Singh. (1970). Structure and development of seeds in three *Ipomoea* species. Jour. Indian Bot. Soc. 49:168-174.
- \* Kaur, H. and R.P. Singh. (1987). Development and structure of seed and fruit in some Convolvulaceae. Phytomorphology 37(2,3):145-154.

- \* Knott, J.E. and J.R. Deanon. (1967). Vegetable Production in Southeast Asia. College of Agriculture. University of the Philippines. Philippines. p 285-289.
- \* Kornerup and J.H. Wanscher. (1978). Methuen Handbook of Colour. Eyre Methuen, London. 252 p.
- \* Larqué, S.A. y Trejo L. C. (1990). El agua en las plantas: manual de prácticas de Fisiología Vegetal. Trillas, México.
- \* Linnemann, A.R. et al. (1986). Influence of nitrogen on sown and ratooned upland KangKong (*Ipomoea aquatica* Forsk) at two planting densities. Netherlands Journal of Agricultural Science 34:15-23.
- \* López C.M.L. (1987). Estudio del ciclo de vida y del desarrollo de la semilla de *Ipomoea x leucantha* (Convolvulaceae) contaminante del arroz comercial. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 63 p.
- \* López, et al. (1990). Ciclo de vida y desarrollo de la semilla de *Ipomoea x leucantha* (Convolvulaceae), arvense del arroz. Phytol 51(1):17-24.
- \* Marbach, I. and A.M. Mayer. (1974). Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. Plant Physiol. 54:817-820.
- \* Marbach, I. and A.M. Mayer. (1975). Changes in catechol oxidase

- and permeability to water in seed coats of *Pisum elatius* during seed development and maturation. *Plant Physiol.* 56:93-96.
- \* Márquez, G.G.J. (1986). Anatomía e Histoquímica del desarrollo de la semilla de *Turbina corymbosa* (L.) Raf. Convolvulaceae. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 149 p.
- \* Martin, W.F. (1984). Handbook of tropical food crops. CRC Press Inc. Boca Raton, Flo.,USA. p 168-170.
- \* Mazia, D. et al. (1953). The cytochemical staining and measurement of protein with Mercuric Bromphenol Blue. *Biological Bulletin.* 104:57-67.
- \* McDonald, J.A. (1982) Biosystematics of the *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Ph. D. Diss., University of Texas, Austin, Texas.
- \* Mckee, G.W. et al. (1977) Seedcoat Structure in *Coronilla varia* L. and its relations to hard seed. *Agronomy Journal.* 69:53-57.
- \* Murguía, S.G. (1986). Estudio comparativo de semillas maduras de dos especies arbóreas del género *Ipomoea* (Convolvulaceae) L. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 61 p.
- \* Pérez, V.A. (1990). Resistencia a la sequía XXIX: Aspectos biológicos y Fisiológicos de la "espinaca de agua", *Ipomoea aquatica* Forsk (Convolvulaceae). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Botánica. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.

135 p.

- \* Plucknett, D.L. and H.L. Beemer. (1981) Vegetable farming systems in China. Report of the visit of the vegetable farming systems delegation to China. Westview Press/Boulder. USA.
- \* Ponce, S R M. et al. (1990). Desarrollo e histoquímica de la cubierta seminal de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Convolvulaceae) y su relación con la impermeabilidad al agua. *Phyton* 51(1):5-12.
- \* Quinlivan, B.J. (1971). Seed coat impermeability in legumes. The journal of the Australian Institute of Agricultural Science 37:283-295.
- \* Rolston, M.P. (1978). Water impermeable seed dormancy. The Botanical Review. 44(3):365-396.
- \* Ruberté, R.M. y F.W. Martin. (1975). Hojas comestibles del Trópico. Agricultural Research Service.
- \* Sampathkumar, R and K.R. Ayyangar. (1982) Seed Morphoanatomy of Convolvulaceae. *J. Indian Bot. Soc.* 61:346-354.
- \* Smith, B. (1977). Atlas a color de técnicas de coloración histológica. Year book Medical Publisher, Inc. Chicago. 192p.
- \* Snyder, H.G. et al, (1981) Trials of *Ipomoea aquatica*, nutritious vegetable with high protein and nitrate extraction potential. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 94:230-235.



- \* Sripleng, A and F.H. Smith. (1960). Anatomy of the seed of *Convolvulus arvensis*. American Journal of Botany. 47:386-392.
- \* Tisbe, V. O. y T. G. Cadiz. (1967) *Convolvulus* or Kangkong. In: vegetable production in Southeast Asia. Knott, E. J. y J. R. Deanon Jr. (Ed). University of Philippines Press. Los Baños Laguna, Philippines. 289 p.
- \* Tiwari, N.C. and V. Chandra. (1985). Water spinach : its varieties and cultivation. Indian Horticulture. 30(2):23-24.
- \* Watson, D.P. (1948). Structure of the testa and its relation to germination in the Papilionaceae Tribes Trifoliae and Loteae. Annals of Botany. 12:385-409.
- \* Woodcock, F.E. (1942). Seed development in the morning glory (*Ipomoea rubrocaerulea* Hook). Papers Mich. Acad. Sci. Arts. and letters. 28:209-212.
- \* Yamaguchi, M. (1983). World vegetables : Principles, production and nutritive values. AVI Publishing Company Inc. Westport. USA.