

003412  
24.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO

Estructura y morfología de granos de polen  
del género *Phaseolus* (Fabaceae:Phaseolinae).

TESINA

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA  
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

SARA FUENTES SORIANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO OCTAVIO DELGADO SALINAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MÉXICO, D.F. 1998

268775



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

*Dedicatoria*

*A mi querida amiga  
confidente  
y amoroso apoyo*

*gracias Madre*

## AGRADECIMIENTOS

Por su apoyo incondicional, por haberme incursionado en la microscopía electrónica, por su dirección de tesis y por todas sus enseñanzas, doy gracias al Doctor Alfonso Delgado.

A mis sinodales y maestros de la Especialidad de Microscopía Electrónica Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Guadalupe Trinidad Zavala, M. en C. Adela Margarita Reyes Salas y Esp. en Mic. Elec. Apli a las Cien. Biol. Marco Antonio González Jiménez por la revisión y valiosas sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Enrique Martínez por su disposición a la exculpulosa revisión del manuscrito, sus acertados comentarios que contibuyeron de manera sustancial a mejorar el trabajo doy un especial reconocimiento.

Doy gracias a mis maestros microscopistas por la instrucción y asesoría a un recién incursionado en el área, M. en C. Margarita Reyes Salas del Instituto de Geología, Diól. Yolanda Ornelas del Instituto de Ciencias del Mar, Biól. Armando Zepeda de la Facultad de Medicina, Dr. Gerardo Vázquez Nin, Dra. Olga Echeverría, Dra. Guadalupe Zavala y Esp. en Mic. Elec. Marco Antonio González.

Agradezco al Instituto de Biología las facilidades para realizar este trabajo, en particular a los jefes en turno Secretaria Administrativa Dr. Alfonso Delgado y Secretaria Técnica Dra. Hilda Flores Olvera.

Un reconocimiento al invaluable apoyo del Laboratorio de Fanerogamia del Instituto de Biología a cargo del M. en C. Pedro Mercado, en el que se desarrolló gran parte del trabajo técnico.

Gracias también por su orientación en palinología a la Biól. Leticia Torres.

Quiero agradecer al Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias en la UNAM así como al Laboratorio del Colegio de Postgraduados en Texcoco, la facilidades otorgadas para la realización de los cortes y observación del material en microscopía electrónica de transmisión.

Por su importante apoyo y asesoría en computo, como en fotografía al Biól. Alfredo Wong.

Gracias al Laboratorio de fotografía a cargo de la Biól. Carmen Loyola, tanto como al del laboratorio de Fanerogamia por permitirme realizar la impresión de las microfotografías. A mi amiga Ivonne Sánchez por su amistad y apoyo incondicional.

Finalmente mil gracias al Dr. Alfonso Delgado por regalarme la gran oportunidad de acercarme al conocimiento biológico con lente tan poderosa, por el privilegio de contribuir al conocimiento y ser espectador de tan maravilloso microcosmos. Por su confianza y motivación gracias.

# CONTENIDO

▪ AGRADECIMIENTOS	i
▪ RESUMEN	ii
▪ INTRODUCCION	1
▪ ANTECEDENTES	6
Generalidades. Morfología del polen	
Morfología del polen en Leguminosas	
▪ OBJETIVOS	12
▪ MATERIAL Y METODO	12
Especies seleccionadas para el estudio	
Técnica de acetólisis según Erdtman (1952) modificada para el género <i>Phaseolus</i>	12
<b>Microscopía fotónica (M.L.)</b>	<b>15</b>
Preparaciones permanentes del polen	
Observación	
<b>Microscopía Electrónica de Transmisión (M.E.T.)</b>	<b>17</b>
<b>Fijación</b>	<b>17</b>
Fijador primario. Aldehídos	
Postfijador. Tetróxido de Osmio	
<b>Deshidratación</b>	<b>17</b>
<b>Preinclusión</b>	<b>18</b>
Preinclusión rápida	
Preinclusion lenta	
<b>Inclusión</b>	<b>18</b>
<b>Ultramicrotomía</b>	<b>19</b>
Cortes semifinos	
Cortes ultrafinos	
<b>Contraste</b>	<b>19</b>
Acetato de Uranilo	
Citrato de plomo	
<b>Observación</b>	<b>20</b>
<b>Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.)</b>	<b>22</b>
<b>Polen entero</b>	<b>22</b>
<b>Polen fragmentado</b>	<b>22</b>
Ultrasonido	
Sonicador de baño	
Sonicador de punta	
Corte	
Corte, según Van Campo & Sivak (1972)	
Cortes semifinos por ultramicrotomo.	
Preparación de cortes para su observación	
<b>Sobreacetólisis</b>	<b>23</b>
<b>Deshidratación</b>	<b>24</b>
<b>Secado por Punto Crítico</b>	<b>24</b>

<b>Cubierta Metálica</b>	<b>24</b>
<b>Observación</b>	<b>25</b>
<b>▪ RESULTADOS</b>	<b>26</b>
<b>Obtención de las medidas</b>	<b>26</b>
<b>Métodos aplicados en este trabajo</b>	<b>27</b>
Microscopia electrónica de Trasmisión	
Microscopia electronica de Barrido	
Material entero	
Material fragmentado	
<b>Análisis de la estructura de la exina con microscopía electrónica</b>	<b>28</b>
<b>Descripciones Palinológicas</b>	<b>29</b>
<i>P. leptostachyus</i>	
<i>P. pauciflorus</i>	
<i>P. pluriflorus</i>	
<i>P. zimapanensis</i>	
<b>▪ DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>▪ LAMINA 1</b>	<b>47</b>
<b>▪ LAMINA 2</b>	<b>48</b>
<b>▪ LAMINA 3</b>	<b>49</b>
<b>▪ LAMINA 4</b>	<b>50</b>
<b>▪ LAMINA 5</b>	<b>51</b>
<b>▪ LAMINA 6</b>	<b>52</b>
<b>▪ LAMINA 7</b>	<b>53</b>
<b>▪ BIBLIOGRAFIA</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

Estudio de la morfología de los tipos polínicos de cuatro especies representativas de tres secciones taxonómicas del género *Phaseolus*.

Se incluyen descripciones palinológicas, en donde las características del polen se observaron con diferentes técnicas de microscopía como: Microscopía Fotónica, Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía Electrónica de Barrido.

Se confirma la presencia de una estructura de la exina granular en las cuatro especies estudiadas.

Se destaca la importancia del análisis de la estructura considerando su variación en el apocolpio y mesocolpio como en el limes de las aperturas.

Finalmente se analizan las características palinológicas de las cuatro especies aquí descritas y su importancia taxonómica.

## INTRODUCCION

En sus inicios el análisis del polen se realizó con ayuda de diferentes técnicas de la microscopía fotónica, recientemente las técnicas de microscopía electrónica se han adoptado como un procedimiento de observación complementario (Martin 1969), incrementando notablemente el conocimiento del grano de polen.

La información palinológica derivada de la observación en el microscopio electrónico de barrido ha revolucionado el estudio de la superficie de las estructuras, debido a la resolución y gran profundidad de foco inalcanzables con la microscopía fotónica (Nowicke & Skvarla 1979). Por ejemplo, se facilita la observación de micromodelos de la superficie tectal (Muller 1979) mientras que el estudio de la estructura de la exina o la pared del polen se realiza sólo con microscopía electrónica de transmisión, de tal modo que "ahora tenemos todos los medios para explorar los caracteres morfológicos del gametófito masculino" como señalan Nowicke y Skvarla (1979).

Como en otras familias, la familia Leguminosae presenta una enorme diversidad de polen, en ocasiones tan especializada, que puede ser útil en la determinación de los géneros (Polhill 1994), su estudio en la última década proporcionó las bases para lograr la diferenciación de al menos las tribus más tropicales del Viejo Mundo de aquellas del Nuevo Mundo como Aeschynomeneae, Desmodieae y Amorphaeae (Ferguson 1984; Ferguson & Skvarla 1981).

La familia Leguminosae o Fabaceae es una de las familias con mayor diversidad en el mundo, superada sólo por las Asteraceae y las Orchidaceae, cuenta con cerca de 650 géneros y 18 000 especies (Polhill *et al.* 1981). Aproximadamente 440 géneros y 1200 especies, pertenecen a la más grande de sus tres subfamilias, la subfamilia Papilionoideae, que se distribuye principalmente en Brasil, México, este de África, Madagascar y la región Chino-Malaya (Polhill *et al.* 1981).

La subfamilia Papilionoideae se divide en cuatro grupos de tribus: 1) el grupo de las tribus basales Sophoreae y Swartzieae, 2) el integrado por arbustos principalmente distribuidas fuera del trópico en ambos hemisferios, 3) el de leñosas con algunas formas herbáceas relativamente más avanzadas como las Phaseoleae, Desmodieae, Aeschynomeneae e Indigoferaeae de regiones tropicales y 4) el grupo de las herbáceas



que se distribuyen en climas templados como las Galegeae, Viciae, Hedysareae y Trifolieae (Polhill 1994).

Un gran número de taxa de importancia económica se incluyen en la tribu Phaseoleae, que se organiza en 7 subtribus

Tribu Phaseoleae

Subtribu (según Lackey 1981):

Cajaninae  
Clitoriinae  
Erythrinae  
Diocleinae  
Glycininae  
Kennediinae  
Ophrestinae  
Phaseolinae

En la subtribu Phaseolinae se ubica el género americano *Phaseolus* que se representa por aproximadamente 40 especies (Delgado-Salinas 1985; Debouck 1988). Sus especies silvestres se distribuyen principalmente: en México, sureste de Canadá hasta el noreste de Argentina (Delgado-Salinas 1985; Delgado-Salinas *et al.* 1993)(Mapa 1).

Debido a su complejidad morfológica, particularmente la floral, el género *Phaseolus* ha sido objeto de estudio desde hace aproximadamente doscientos años. En este tiempo se ha generado una intrincada historia taxonómica reflejada simplemente en una gran lista de cerca de 490 nombres (Delgado-Salinas 1985; Debouck 1988).

En los últimos años, varios autores como Verdcourt, Maréchal, Mascherpa y Stainier (Delgado-Salinas *et al.* 1982; Delgado-Salinas 1985), han contribuido notablemente a la Sistemática del género integrando una interesante propuesta de clasificación que incluye a otros géneros relacionados (Delgado-Salinas *et al.* 1982).

El género *Phaseolus* se distingue morfológicamente de acuerdo con Maréchal *et al.* (1978) por los siguientes caracteres:

- Estípulas no prolongadas fuera de la base
- Presencia de tricomas uncinados
- Brácteas florales persistentes aún después de la antesis
- Nudos de los raquis de la inflorescencia no engrosados
- Glándulas extrafloras del raquis ausentes
- Estandarte simétrico
- Estilo en espiral
- Estilo caduco no persistente en el fruto y
- Fruto no septado



Mapa 1. Distribución geográfica del género *Phaseolus*

Con base en una serie de caracteres morfológicos y moleculares (como los de variación de los sitios de restricción en ADN de cloroplastos) Delgado-Salinas (1985) y Delgado-Salinas *et al.* (1993) a su vez, han propuesto una clasificación infragenérica, en la que dividen al género en cuatro secciones: *Phaseolus*, *Minkellersii*, *Xanthotrichii* y *Chiapasanii*.

Por lo tanto la ubicación taxonómica del género *Phaseolus* actualmente es la siguiente:

Familia: Leguminosae  
 Subfamilia: Papilionoideae  
 Tribu: Phaseoleae  
 Subtribu: Phaseolinae  
 Género: *Phaseolus*  
 Sección: *Phaseolus*  
           *Minkellersii*  
           *Xanthotrichii*  
           *Chiapasanii*

Stainier & Horvat (1978); Maréchal *et al.* (1981) y Delgado-Salinas *et al.* (1982) distinguen el polen del género *Phaseolus* por los caracteres que se resumen en el cuadro 1:

<i>Phaseolus spp.</i>	<i>Phaseolus chiapasanus</i>
Polen tricolporado o triporado	Tricolporado
Presencia o ausencia de pseudocolpo	Ausencia de pseudocolpo
esbozo del mismo	esbozo del mismo
Ornamentación lisa a finamente reticulada	Ornamentación ampliamente reticulada
Infractectum de naturaleza columelar	Infractectum granular

Cuadro 1. Caracteres palinológicos distintivos del género *Phaseolus*. Se integra lo publicado para el género según Maréchal *et al.* (1978) y para *P. chiapasanus* según Delgado-Salinas *et al.* (1985).

Guinet (1981), Ferguson & Skvarla (1981) señalan que en algunos grupos taxonómicos de Leguminosas la variación de las aperturas, la estructura de la exina y la ornamentación coincide con la de la macromorfología, lo que evidencia su importancia en la tarea taxonómica.

Stainier & Horvat (1978, 1979, 1983) consideran que en el complejo taxonómico *Phaseolus-Vigna* la estructura de la exina es de relevancia para la interpretación de su evolución. Determinan que la estructura granular, presente en *Vigna*, es un carácter derivado y la estructura columelar presente en *Phaseolus*, como primitivo.

**f) Aperturas.**- Otro rasgo importante en la descripción del polen son las aperturas. En la exina frecuentemente se presentan adelgazamientos o modificaciones locales que son llamadas aperturas, por las que generalmente surge el tubo polínico que ha de emerger en el momento de la germinación del grano de polen (Muller 1979; Larson & Lewis 1961; Heslop-Harrison 1979). Estas también proveen rutas para transferir agua u otras substancias (Punt *et al.* 1994).

En las Angiospermas las aperturas son sumamente variables, mientras que en las Monocotiledoneas se presentan sulcos en las dicotiledoneas colpos.

Por la forma, posición y estructura, en las dicotiledoneas se reconocen varios tipos de aperturas (Wodehouse 1953; Erdtman 1952; Muller 1979). Por ejemplo si consideramos la forma distinguimos las aperturas tipo colpo o poro, las primeras son aperturas elongadas con una relación largo-ancho mucho mayor de dos y las segundas son aperturas, circulares o elípticas con una relación largo-ancho menor de dos (Punt *et al.* 1994).

Si se considera la capa de la exina que las originan entonces se definen las aperturas simples o compuestas. Las simples derivan de una capa de la exina a diferencias de las compuestas en las que se incluyen más de una capa de la exina (Punt *et al.* 1994).

En aperturas compuestas las ectoaperturas se presentan en la ectexina, las endoaperturas afectan la endexina y la mesoaperturas la posición intermedia a las ectoaperturas y endoaperturas (Punt *et al.* 1994).

Las aperturas compuestas se han interpretado evolutivamente avanzadas porque frecuentemente se presentan en grupos taxonómica y evolutivamente más avanzados, Stainier & Horvat (1983), Muller (1979), Walker & Doyle (1975) establecen que como un proceso secundario, existe una tendencia a la reducción e incluso desaparición de las aperturas.

**g) Exina.**- La protección del gametofito masculino o polen en plantas vasculares, se concentra en una cubierta que presenta una capa interna pecto-celulósica denominada intina y una externa, rica en carotenoides oxidativos y/o ésteres de carotenoides o esporopolenina, llamada exina (Faegri & Iversen 1964; Muller 1979; Saxena 1993).

La exina se componen en general por una serie de capas que pueden variar en su morfología, es la capa que presenta mayor resistencia, y la que se utiliza para realizar los estudios palinológicos.

La descripción de las capas de la exina por diferentes autores comentan algunos autores como Bronckers (1968), Walker (1974); Walker & Doyle (1975) ha generado una gran variedad de clasificaciones. Las clasificaciones de la exina se dividen como clasificaciones derivadas de la observación con microscopía fotónica y las derivadas de la observación con microscopía electrónica de transmisión.

El estudio de la exina con las técnicas de microscopía fotónica para polen acetolizado, típicamente presenta dos capas (Faegri & Iversen 1964), una interna basal denominada endexina (exina no esculpurada, que no se tiñe) y una externa o ectexina (exina esculpurada, que se tiñe).

Por otro lado, con ayuda de la microscopía electrónica de transmisión se ha determinado que en las Angiospermas la ectexina puede presentar tres capas, una interna con una estructura columelar o granular cubierta por una capa denominada tectum, y por debajo de éstas la capa basal denominada en inglés foot layer, con una electrodensidad diferente a la endexina (fig. 1).

La estructura infratectal del polen puede ser de dos tipos, columelar y granular. Se dice que existen estructuras columelares cuando se presentan cuerpos cilíndricos, isodiamétricos con elementos bien separados generalmente más altos que anchos (Faegri & Iversen 1964), mientras que las estructuras granulares propuestas por Van Campo & Lugardon (1973) se describen como columelas que fueron remplazadas por cuerpos esféricos; algunas veces también pueden encontrarse combinaciones de ambas o granulos ordenados que semejan pilas de esferas.

## ANTECEDENTES

### Generalidades. Morfología del polen

Caracteres como esculpura, estructura, forma, polaridad, simetría, aperturas y exina, ayudan a describir el polen. A continuación se describen brevemente estos conceptos:

**a) Ornamentación.**- Todas las formas geométricas dispuestas superficialmente en el tectum constituyen la esculpura del polen (Faegri & Iversen 1964).

**b) Estructura.**- Construcción interna de la pared del polen (Punt *et al.* 1994)

**c) Forma.**- Es la configuración espacial de un cuerpo, se relaciona con el tipo de apertura, polaridad y simetría. De acuerdo con Erdtman (1952) la descripción de forma del polen se basa en la relación entre eje polar (P) y diámetro ecuatorial (E) multiplicado por 100.

$$P/E \times 100 = \text{Forma}$$

las diferentes clases de forma se resumen en el siguiente cuadro:

Forma	P/E x 100
Peroblado	<50
Oblado	50-75
Subesferoidal	75-133
Suboblado	75-88
Oblado Esferoidal	88-100
Prolado esferoidal	100-114
Subprolado	114-133
Prolado	133-200
Perprolado	>200

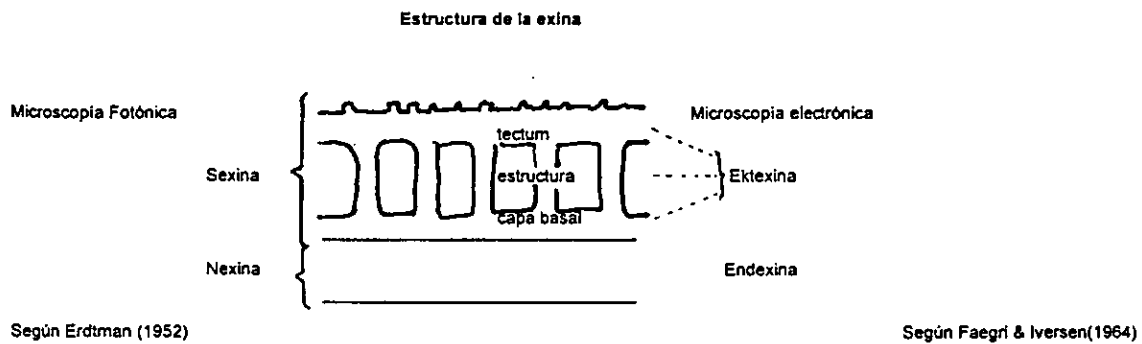
Cuadro 2. Clases de forma propuestas por Erdtman (1952).

**d) Polaridad.**- Se refiere a la posición relativa de los distintos polos (Jackson 1928; en: Punt *et al.* 1994).

**e) Simetría.**- La simetría en el polen es semejante a la que se maneja para todo cuerpo tridimensional, en términos generales puede expresarse como asimétrico o simétrico.

Sin embargo en una de las secciones de *Phaseolus* Delgado-Salinas *et al.* (1982), describen por primera vez una estructura granular, condición que se reporta en taxa cercanos como *Vigna* subgénero *Sigmoidotropis*, u en otros que no son característicos de las Phaseoleae (Stainier & Horvat 1978; Maréchal *et al.* 1981). Por lo que surgió una interesante interrogante.

Por lo anterior se propuso el presente estudio que contribuirá a esclarecer y complementar el estudio taxonómico y palinológico de este interesante grupo.



**Figura 1.** Estructura de la exina.

## MORFOLOGIA DEL POLEN EN LEGUMINOSAS

Excluyendo los granos de polen compuestos, particularmente presentes en la subfamilia Mimosoideae los tipos básicos de polen típicos de la familia Leguminosae son (Guinet 1981):

- Granos únicos
- Isopolares
- Más o menos esferoidales
- De talla pequeña (20-35  $\mu\text{m}$  o más largos en los ejes)
- Granos tricolporados con endo- aberturas isodiamétricas
- Estratificación de la exina típica de las Angiospermas (fig. 1)
- Exina semitectada
- Estructura columelar
- Capa basal poco o bien desarrollada en relación inversamente proporcional a la endexina

Las principales variaciones de la morfología del polen dentro de las subfamilias se describen brevemente en el cuadro 3.

### Aberturas en Leguminosas

En general, también, se señala que hay una tendencia hacia la reducción de las aberturas, de colpos a poros, así como una tendencia a la fusión de los colpos en los polos (sincolpados). El poro puede ser operculado o no, mientras que los colpos pueden ser operculados o con una membrana granular o no (Ferguson & Skvarla 1979).

### Estratificación de la exina en Leguminosas

Existen tendencias principales:

- Presentar una endexina bien desarrollada casi siempre con el mismo grosor de la capa basal.



- Contar con una estructura columelar igual o más grande que la endexina y la capa basal juntas (nexina).
- Tener un tectum más o menos la mitad del grueso de las columelas.

	Caesalpinoideae	Mimosoidea	Papilionoidea
Estructura infratectal de la exina	Usualmente columelar, ocasionalmente granular-columelar, rara vez granular ( <i>Bauhinia</i> )	Usualmente granular	Usualmente columelar, ocasionalmente granular (principalmente en grupos tropicales)
Configuración de las aperturas	Usualmente colpado o colporado rara vez pluriporado	En los tipos básicos pluriporado, tricolporado (tanto en granos simples como compuestos)	Usualmente colporado (tres o más aperturas) muy rara vez pluriporados
Membranas de las aperturas	Inconspicuamente engrosada (sin pseudooperculosu operculos) Excepto en <i>Colophospermum</i> , <i>Hardwickia</i> y <i>Sindora</i>	Inconspicuamente engrosada (sin pseudooperculosu operculos) Excepto en grupos de <i>Leucaena</i> , <i>Desmanthus</i> y <i>Prosopis</i> (granos simples engrosados en la apertura ecuatorial??)	Regularmente engrosados (pseudoperculosu operculos con granulos gruesos)
Granos de polen simples o compuestos	Simple. Excepto en <i>Atzelia</i> y <i>Diptychandra</i>	Usualmente compuestos (tetradas/poliadas), simples en los tipos básicos	Simple
Ornamentación	Frecuentemente estriada, algunas veces con espinas y espinulas	Usualmente areolada, ocasionalmente estriado (y asociado con colpory?). Espinas y espinulas ausentes	Usualmente reticulados, no estriados (una ligera tendencia a ser estriados en <i>Swartzia</i> ), espinas y espinulas poco frecuentes

**Cuadro 3.** Principales características palinológicas que definen a las subfamilias de Leguminosae. (Tomado de Guinet 1981).

Sin embargo, existen dos desviaciones principales que se relacionan fuertemente a la especialización macromorfológica (Ferguson & Skvarla 1981):

a) Engrosamiento de la endexina con decremento o desaparición de la capa basal estructura y tectum.

b) Disminución de la endexina con el subsecuente engrosamiento de la capa basal, estructura y tectum capas superiores, en particular con grandes columelas.

Por otro lado, ciertas tribus presentan variaciones particulares por ejemplo en las Phaseoleae existe una tendencia a la desaparición de columelas que son substituidas por gránulos (Ferguson & Skvarla 1981).

Presenta una gran variación de micromodelos tectales. El más común es el reticulado, también pueden ser lisos, finamente perforados, foveolados, finamente a ampliamente reticulados con inclusiones en los lúmenes, estriados a rugulados (Ferguson & Skvarla 1981). Hay una tendencia hacia la especialización de granos finamente perforados a granos con amplios lúmenes y escultura diferente; y a su vez, con patrones de escultura diferentes sobre los márgenes de los colpos o los también denominados márgos y áreas polares. En *Phaseoleae* hay una tendencia secundaria al desarrollo de lúmenes pequeños generados por estructuras para formar un tectum muy cerrado con muros suprategmiales.

En la subtribu *Phaseolinae* Stainier y Stainier y Horvat (1974, 1976, 1978) y Maréchal *et al.* (1978), han destacado la especialización del polen a nivel de la estratificación de la pared, especialmente presente en el complejo taxonómico *Phaseolus-Vigna*.

Tomando en consideración esta especialización en *Phaseolus* y géneros afines y dado la importancia probada que tiene la microscopía electrónica en el estudio del polen se planteó esta tesis.

	Caesalpinoideae	Mimosoidea	Papilionoidea
Estructura infrategmial de la exina	Usualmente columelar, ocasionalmente granular-columelar, rara vez granular ( <i>Bauhinia</i> )	Usualmente granular	Usualmente columelar, ocasionalmente granular (principalmente en grupos tropicales)
Configuración de las aperturas	Usualmente colgado o colporado rara vez pluriporado	En los tipos básicos pluriporado, tricolporado (tanto en granos simples como compuestos)	Usualmente colporado (tres o más aperturas) muy rara vez pluriporados
Membranas de las aperturas	Inconspicuamente engrosada (sin pseudooperculosu operculos). Excepto en <i>Colophospermum</i> , <i>Hardwickia</i> y <i>Sindora</i>	Inconspicuamente engrosada (sin pseudooperculosu operculos). Excepto en grupos de <i>Leucaena</i> , <i>Desmanthus</i> y <i>Prosopis</i> (granos simples engrosados en la apertura ecuatorial??)	Regularmente engrosados (pseudooperculo u operculos con granos gruesos)
Granos de polen simples o compuestos	Simple. Excepto en <i>Afzelia</i> y <i>Diptychandra</i>	Usualmente compuestos (tetradas/poliadas), simples en los tipos básicos	Simple
Ornamentación	Frecuentemente estriada, algunas veces con espinas y espinulas	Usualmente areolada, ocasionalmente estriado (y asociado con colporo?). Espinas y espinulas ausentes	Usualmente reticulados, no estriados (una ligera tendencia a ser estriados en <i>Swartzia</i> ), espinas y espinulas poco frecuentes

**Cuadro 3.** Principales características palinológicas que definen a las subfamilias de Leguminosae. (Tomado de Guinet 1981).

## OBJETIVOS

Describir la morfología del polen de las cuatro secciones de *Phaseolus*, basada en especies representativas y apoyada en observaciones en microscopía electrónica y de luz

Interpretar el valor evolutivo y taxonómico de las características morfológicas del polen en *Phaseolus*.

## MATERIAL Y METODO

### Especies seleccionadas para el estudio

Considerando las variaciones macromorfológicas se seleccionaron especies representativas de las secciones del género *Phaseolus* según Delgado-Salinas (1985). En el caso de la sección *Minkellersii* se seleccionaron dos especies muy diferentes en cuanto a su macromorfología, los datos de las especies considerados para este estudio y los ejemplares que respaldan dichas especies se anotan en el cuadro 4.

### Técnica de acetólisis según Erdtman (1952) modificada para el género *Phaseolus*

El procesamiento consistió en extraer el polen de aproximadamente 10-20 botones florales del material herborizado de las especies en estudio, depositados en el Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU), el cual fue acetolizado según la técnica de Erdtman (1952).

Los botones florales fueron colocados en tubos ependorf rehidratados con agua destilada a baño maría durante 10 minutos, macerados con la ayuda de espátulas y centrifugados a 6000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó.

La muestra contenida en el fondo de los tubos ependorf (pastilla de la muestra biológica, PMB) fue resuspendida en hidróxido de potasio (KOH) al 5% durante 10 minutos a baño maría a 60 °C, luego se centrifugó a 6000 r.p.m durante 5 minutos.

## OBJETIVOS

Describir la morfología del polen de las cuatro secciones de *Phaseolus*, basada en especies representativas y apoyada en observaciones en microscopía electrónica y de luz

Interpretar el valor evolutivo y taxonómico de las características morfológicas del polen en *Phaseolus*.

## MATERIAL Y METODO

### Especies seleccionadas para el estudio

Considerando las variaciones macromorfológicas se seleccionaron especies representativas de las secciones del género *Phaseolus* según Delgado-Salinas (1985). En el caso de la sección *Minkellersii* se seleccionaron dos especies muy diferentes en cuanto a su macromorfología, los datos de las especies considerados para este estudio y los ejemplares que respaldan dichas especies se anotan en el cuadro 4.

### Técnica de acetólisis según Erdtman (1952) modificada para el género *Phaseolus*

El procesamiento consistió en extraer el polen de aproximadamente 10-20 botones florales del material herborizado de las especies en estudio, depositados en el Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU), el cual fue acetolizado según la técnica de Erdtman (1952).

Los botones florales fueron colocados en tubos ependorf rehidratados con agua destilada a baño maría durante 10 minutos, macerados con la ayuda de espátulas y centrifugados a 6000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó.

La muestra contenida en el fondo de los tubos ependorf (pastilla de la muestra biológica, PMB) fue resuspendida en hidróxido de potasio (KOH) al 5% durante 10 minutos a baño maría a 60 °C, luego se centrifugó a 6000 r.p.m durante 5 minutos.

## OBJETIVOS

Describir la morfología del polen de las cuatro secciones de *Phaseolus*, basada en especies representativas y apoyada en observaciones en microscopía electrónica y de luz

Interpretar el valor evolutivo y taxonómico de las características morfológicas del polen en *Phaseolus*.

## MATERIAL Y METODO

### Especies seleccionadas para el estudio

Considerando las variaciones macromorfológicas se seleccionaron especies representativas de las secciones del género *Phaseolus* según Delgado-Salinas (1985). En el caso de la sección *Minkellersii* se seleccionaron dos especies muy diferentes en cuanto a su macromorfología, los datos de las especies considerados para este estudio y los ejemplares que respaldan dichas especies se anotan en el cuadro 4.

### Técnica de acetólisis según Erdtman (1952) modificada para el género *Phaseolus*

El procesamiento consistió en extraer el polen de aproximadamente 10-20 botones florales del material herborizado de las especies en estudio, depositados en el Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU), el cual fue acetolizado según la técnica de Erdtman (1952).

Los botones florales fueron colocados en tubos ependorf rehidratados con agua destilada a baño maría durante 10 minutos, macerados con la ayuda de espátulas y centrifugados a 6000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó.

La muestra contenida en el fondo de los tubos ependorf (pastilla de la muestra biológica, PMB) fue resuspendida en hidróxido de potasio (KOH) al 5% durante 10 minutos a baño maría a 60 °C, luego se centrifugó a 6000 r.p.m durante 5 minutos.

A la PMB se le agregó ácido acético glacial, se maceró, resuspendió y centrifugó durante cinco minutos 3 veces, desechando cada vez el sobrenadante.

Después a la PMB se le agregó la mezcla acetolítica preparada con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado en proporción 9:1 durante 10 minutos a 90°C agitando esporádicamente.

A continuación se neutralizó la reacción agregando ácido acético glacial en una proporción 1:1, la muestra biológica se centrifugó durante 5 minutos, decantó el sobrenadante, y la PMB se lavó con ácido acético glacial dos veces más centrifugando cinco minutos cada vez. La PMB se enjuagó con agua destilada dos veces centrifugando 5 minutos cada vez, concluyendo la técnica de acetólisis (fig. 2). El material acetolizado se procesó para su observación en microscopía fotónica (MF), microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) con las técnicas detalladas a continuación.

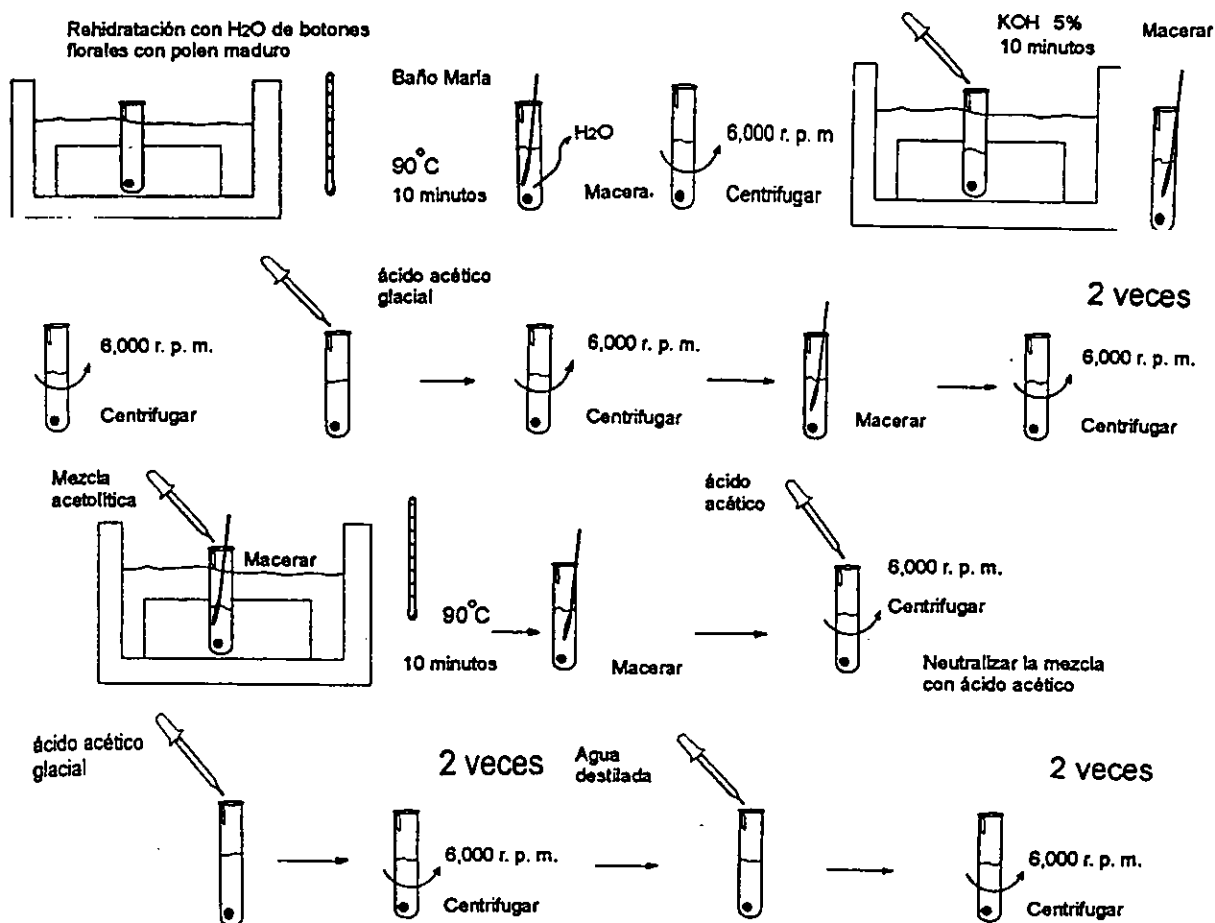


Figura 2. Técnica de acetólisis según Erdtman (1952) modificada para el género *Phaseolus*

TAXA	COLECTOR	LOCALIDAD	HERBARIO
<b>Sección Phaseolus D.C.</b> <i>Phaseolus leptosthachyus</i> Bentham	<u>A. Delgado-Salinas 080995</u> <u>G. Flores-Franco 123</u> <u>G. Flores-Franco 3566</u> <u>R. Hernández 8975</u>	Distrito Federal Morelos Oaxaca Chihuahua	MEXU MEXU MEXU MEXU MEXU
<b>Sección Minkellersii (Mart. Gal.) Maré.,            Masch. &amp; Stain.</b> <i>Phaseolus pauciflorus</i> Sessé & Mociño ex G. Don  <i>Phaseolus pluriflorus</i> Maré., Masch. & Stain.	<u>A. Delgado-Salinas 1503</u> <u>J.C. Soto 10262</u> <u>C.R. Torres 10082</u> <u>J. Espinosa 2218</u> <u>J. Espinosa 2256</u>	Jalisco Edo. México Edo. México Michoacán Michoacán	MEXU MEXU MEXU MEXU MEXU
<b>Sección Xanthotrichii</b> A. Delgado <i>Phaseolus zimapanensis</i> A. Delgado <i>sp. nov.</i>	<u>A. Delgado-Salinas 1131</u>	Hidalgo	MEXU

Cuadro 4. Datos de las especies y colectas tomadas como referencia para hacer el estudio

### Microscopía fotónica (M. F.)

El material acetolizado se montó en preparaciones permanentes que fueron examinadas al microscopio fotónico con la técnica de campo claro (Bertrand 1961).

#### Preparaciones permanentes de polen

En un portamuestras se colocó una porción de gelatina glicerizada sólida, que se funde con calor antes de mezclarla con una gota de la pastilla de la muestra biológica (PMB) obtenida después de la última centrifugación de la técnica de acetólisis; la mezcla se realizó con un palillo. Se cubrió con un cubreobjetos, se dejó secar durante dos días y se selló con barniz por las orillas. Cada preparación se identificó con el nombre de la especie, colector y número de colecta (fig. 4).

#### Observación

Cada preparación se observó con las técnicas de iluminación de contraste de fases y de iluminación de luz-obscuridad (análisis L-O) descrita por Erdtman (1952). Esta última consiste en el ajuste gradual del foco, empezando desde la parte superior de una estructura ornamentada y continuando con un progresivo desenfoque.

Para ello se realizaron 10 mediciones de cada uno de los siguientes caracteres utilizando un ocular graduado (fig. 3):

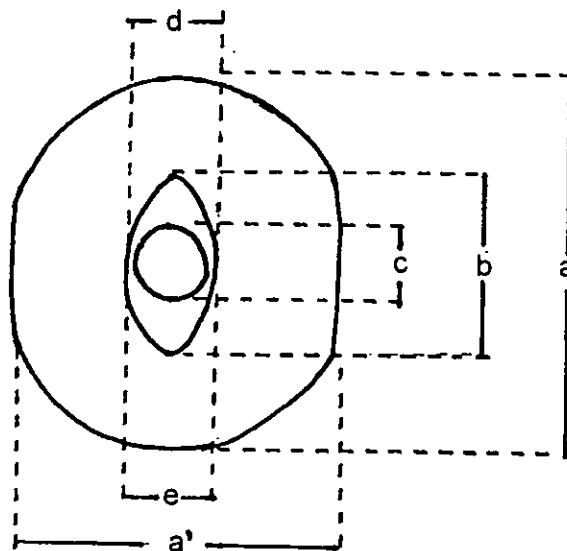


Figura 3. Esquema de las zonas medidas en los granos de polen. a. Longitud del eje polar y ecuatorial. b. Longitud polar de la ectoapertura. c. Longitud polar de la endoapertura. d. Longitud ecuatorial de la ectoapertura. e. Longitud ecuatorial de la endoapertura.



Las mediciones obtenidas fueron analizadas estadísticamente para obtener la media aritmética y la desviación estándar.

### Registro de las imágenes

Se tomó registro de cada una de las estructuras analizadas en un Axioscop Zeiss, con una cámara fotográfica Contax en película Kodak X-Pan ISO 125 con formato de 35 mm.

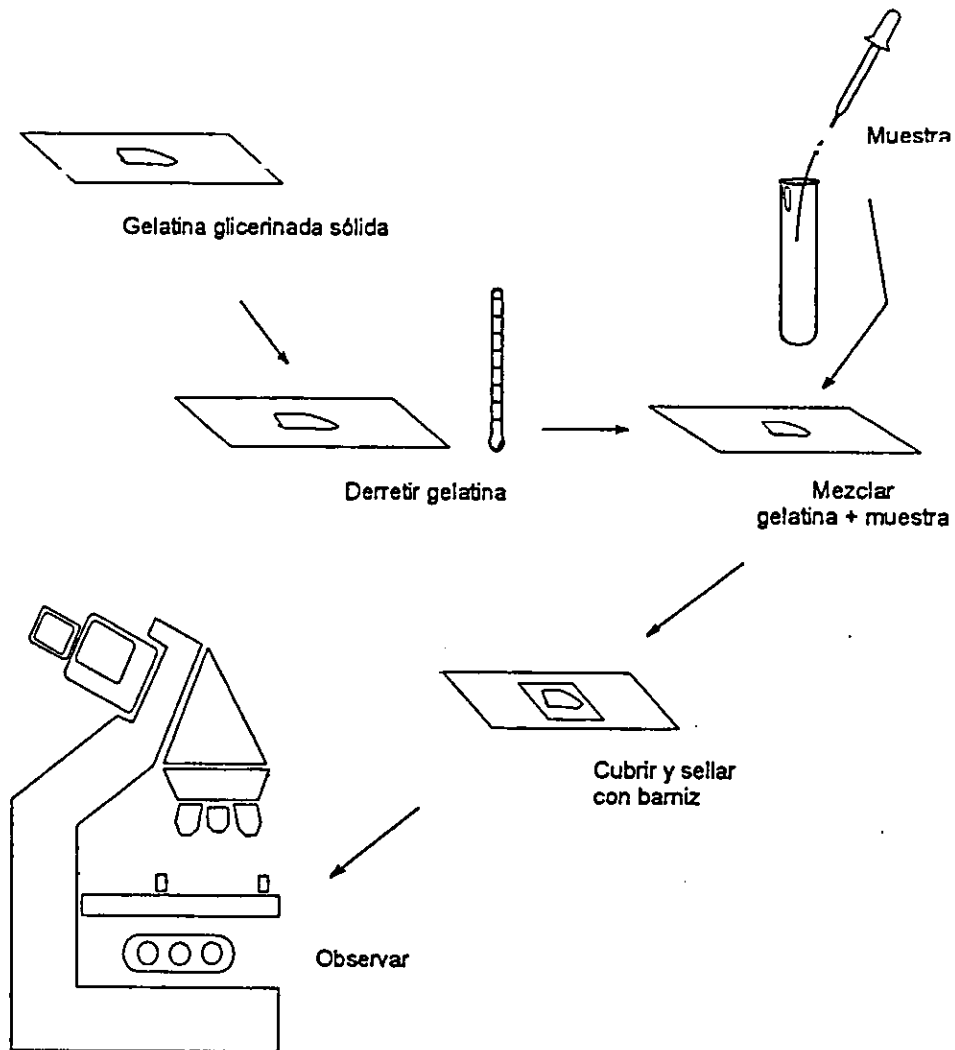


Figura 4. Preparaciones permanentes de granos de polen

## **Microscopía Electrónica de Transmisión (M.E.T.)**

Para caracterizar la estructura de la exina del polen, se realizaron preparaciones que fueron observadas en Microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Se hicieron pruebas durante la etapa de fijación e inclusión del material, con el fin de ajustar la técnica para poder procesar el material a observar en MET (fig. 5).

El polen acetolizado se tomó de la PMB obtenida durante la última centrifugación de la técnica de acetólisis (ver técnica de acetólisis).

### **Fijación**

Se eligió el protocolo de doble fijación con aldehídos- tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ), variando el fijador primario.

#### **▪ Fijador primario. Aldehídos**

Se utilizaron como fijadores primarios dos aldehídos diferentes en lotes experimentales diferentes:

- 1) glutaraldehído al 2.5 % durante 1: 30 hr.
- 2) glutaraldehído al 2.5% más paraformaldehído al 4% durante 1:30 hr.

La fijación en ambos caso se realizó durante los primeros cinco minutos,

- 1) en condiciones de vacío
- 2) en condiciones normales, sin vacío.

#### **▪ Post fijador o fijador secundario. Tetróxido de Osmio**

Las muestras fijadas se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos al 0.16 M y pH 7.2, centrifugando cada vez durante cinco minutos, a 6000 r.p.m.. Se les agregó una mezcla de tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) con una solución amortiguadora de fosfatos en relación 1:1, durante dos horas, al cabo de las cuales se lavaron con la solución amortiguadora de fosfatos durante tres veces, centrifugando cada vez durante cinco minutos, a 6000 r. p. m.

### **Deshidratación**

El polen acetolizado se deshidrató bajo dos condiciones:

- 1) muestras resuspendidas en agar al 3 %.
- 2) muestras en estado libre.

Estas últimas se centrifugarán durante cinco minutos a 6000 r.p.m. después de cada cambio de tratamiento.

En ambos casos las deshidrataciones se realizaron con cambios sucesivos de alcoholes graduales, partiendo desde el alcohol al 30% hasta el 96%, realizando cambios de alcohol cada 10 minutos.

En el alcohol al 100 % se llevaron a cabo tres cambios, cada 10 minutos.

Antes de efectuar la inclusión, el material fue sumergido en óxido de propileno, efectuando tres cambios cada 10 minutos.

### **Preinclusión**

Se realizaron dos rutas de preinclusión.

#### **▪ Preinclusión rápida**

Se preparó la resina epóxica de dos tipos: 1) epon y 2) eponato con un grado de dureza medio. La mezcla de preinclusión se preparó con la resina y óxido de propileno.

Tanto el material embebido en agar, como el material libre, fijado en condiciones de vacío y en condiciones normales (sin vacío), con glutaraldehído y con glutaraldehído-paraformaldehído se preincluyó durante 24 hrs con una mezcla de preinclusión en proporción 1:1.

#### **▪ Preinclusión lenta**

El material libre, fijado en condiciones normales con glutaraldehído se preincluyó en una mezcla de eponato:

- 1) durante 24 hrs. en una proporción 3:1 de óxido de propileno-eponato respectivamente.
- 2) se resuspendió con una mezcla de preinclusión en proporción 2:1 de óxido de propileno-eponato durante 24 hrs.
- 3) se resuspendió con una mezcla de preinclusión en proporción 1:1 de óxido de propileno-eponato durante 24 hrs.
- 4) se resuspendió con una mezcla de preinclusión en proporción 1:2 de óxido de propileno-eponato durante 24 hrs.
- 5) se resuspendió con una mezcla de preinclusión en proporción 1:3 de óxido de propileno-eponato durante 24 hrs., posteriormente se evaporó de la mezcla de preinclusión el óxido de propileno durante 2 hrs.

### **Inclusión**

Se retiró la última mezcla de preinclusión y se adicionó para todos los casos (para epon como para eponato) la resina pura con características de polimerización de dureza

media. Se polimerizó la resina con la muestra embebida, dejando las muestras en una estufa a 60 C° durante 24 hrs.

### **Ultramicrotomía**

La resina con la muestra incluida y polimerizada se talló hasta obtener una pirámide que circunscribiera en su ápice tan sólo un área con el material biológico.

Tanto los cortes semifinos como ultrafinos se obtuvieron con los ultramicrotomos de avance mecánico MT-1 y MT-2 del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM y el ultramicrotomo de avance térmico OmU3, del Colegio de Postgraduados.

#### **▪ Cortes semifinos**

De los bloques tallados se obtuvieron cortes semifinos de aproximadamente 0.5-1.0 µm de grosor con los que se localizó el área de corte específica para su observación en el MET; se reconoció el grosor del corte observando el corte a contraluz, estos cortes se encontraron en el rango de verde a rojo. Se rescataron con un asa y fijaron con calor, después se tiñeron con una gota azul de toluidina exponiéndolos a calor y se enjuagaron con agua destilada, luego se montaron en un portaobjetos y se observaron en un microscopio óptico.

#### **▪ Cortes ultrafinos**

Se obtuvieron cortes ultrafinos con grosores aproximados de 50-90 nm. El grosor como fue el caso de los cortes semifinos se detectó por el color a contraluz de los mismos, eligiendo como cortes ultrafinos aquellos con coloración gris a dorado pálido. Estos se rescataron en rejillas metálicas de cobre con malla 100, cubiertas con membranas de fomvar.

### **Contraste**

#### **Acetato de Uranilo**

Las rejillas con los cortes fueron contrastadas con una gota de acetato de uranilo durante 20 minutos en una caja de petri cubierta, enjuagadas por goteo con agua bidestilada y luego secadas durante cinco minutos.

### **Citrato de Plomo**

Las rejillas contrastadas con acetato de uranilo se contrastaron con una gota de citrato de plomo, durante 10 minutos en una caja de petri con ambiente seco (con hojuelas de hidróxido de sodio), se enjuagaron con agua bidestilada por goteo y se secaron para su observación al MET.

### **Observación**

Los cortes fueron revisados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss M-10, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM.

### **Registro de las imágenes**

Las imágenes se recuperaron en negativo con película Kodak tipo 4489 de 3 1/4" x 4" y fueron impresas en papel F3 con una lente 80 mm, 1:45 y una Magnolar II 60 mm, 1:45.

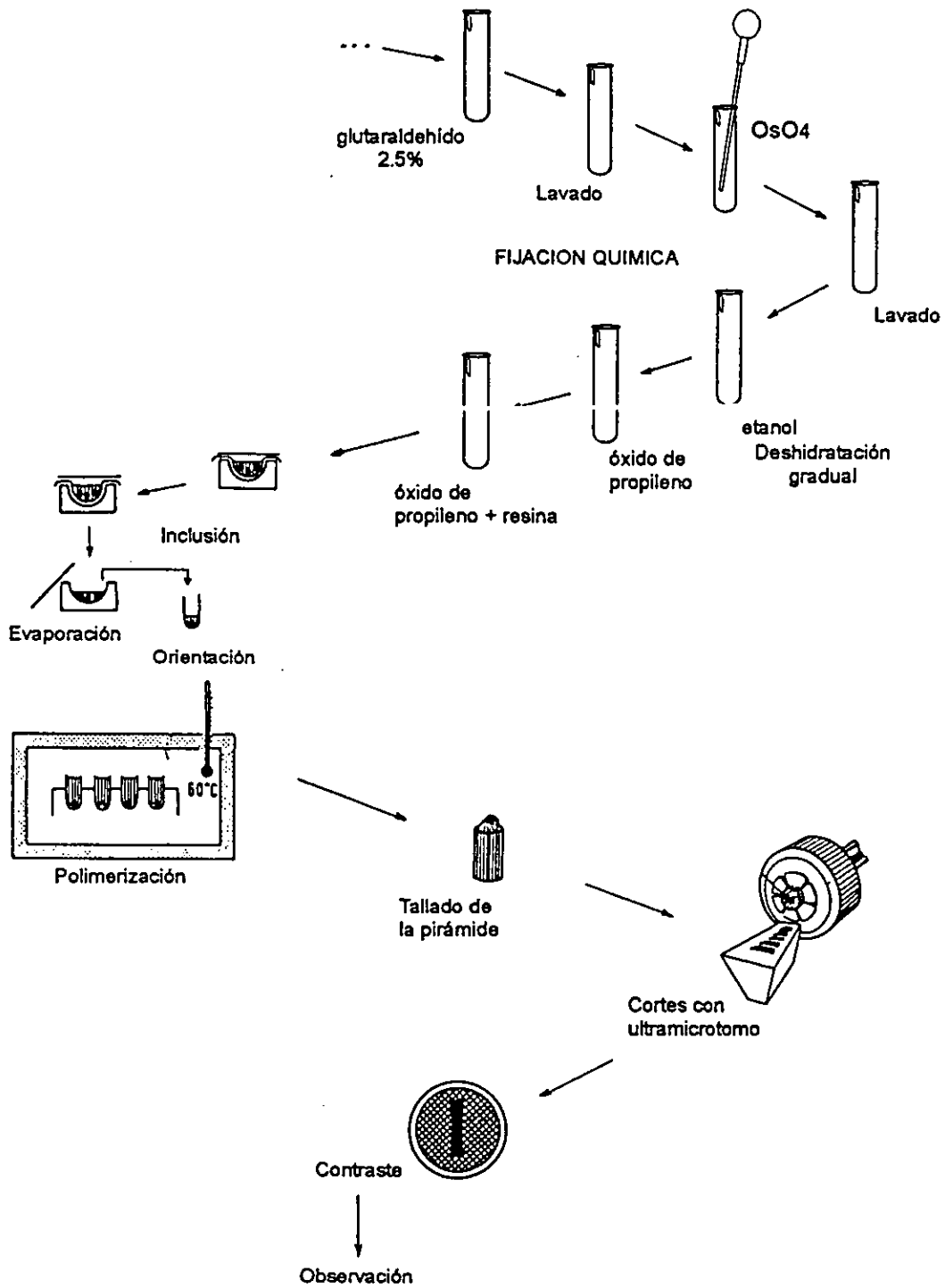


Figura 5. Preparaciones de cortes de polen para su observación en el microscopio electrónico de transmisión.

## Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.)

Para la observación de la morfología externa del polen entero, como para la observación de cortes de la exina del polen se procesó el material siguiendo varias metodologías que a continuación se describen (fig. 6).

### Polen entero

El polen acetolizado, se deshidrató (ver deshidratación abajo), se secó con la técnica de secado por punto crítico (ver secado por punto crítico abajo), se montó en portaobjetos de aluminio con cinta conductiva de carbón y se cubrió con oro (ver cubierta metálica abajo).

### Polen fragmentado

El polen se fragmentó siguiendo tres técnicas

#### ▪ Ultrasonido

Se adaptó la técnica de fraccionamiento por ultrasonido según Cerceau *et al.* (1970), que consiste en el uso de frecuencias cortas y bajas de sonido. La fragmentación del polen se realizó con dos equipos de ultrasonido:

#### Sonicador de baño

Los tubos ependorf con el polen acetolizado se colocaron en un sonicador de baño o de cubeta Branson durante 20 minutos con ciclo continuo, en el Instituto de Geología, UNAM. La muestra biológica se deshidrató (ver deshidratación abajo), se secó con la técnica de secado de punto crítico (ver secado de punto crítico abajo) y se cubrió con oro (ver cubierta metálica abajo).

#### Sonicador de punta

Los tubos ependorf con el polen acetolizado se colocaron en un sonicador de punta Branson modelo 250 durante 5 minutos con ciclo continuo con intensidad 5, en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Se deshidrataron (ver deshidratación abajo), se secaron con la técnica de secado de punto crítico (ver secado de punto crítico abajo) y se cubrieron con oro (ver cubierta metálica abajo).

## ▪ CORTE

El corte del polen se realizó con dos técnicas.

### **Corte libre, según Van Campo & Sivak (1972)**

El polen acetolizado se deshidrató (ver deshidratación abajo), se secó con la técnica de secado por punto crítico (ver secado por punto crítico abajo), se montó en un portamuestra de aluminio con un cinta adhesiva de carbón. Bajo la amplificación de un microscopio estereoscópico, se cortó con el filo de una navaja y se cubrió con oro (ver cubierta metálica abajo).

### **Cortes semifinos por ultramicrotomo según Hideux & Marceu (1972)**

Se obtuvieron cortes semifinos del polen acetolizado, fijado con glutaraldehído al 2.5% en condiciones normales, incluido en eponato en forma libre, y con un preinclusión lenta. Estos cortes se recuperaron con un asa y se montaron por calor en un portamuestras.

### **Preparación de cortes para su observación.**

Se emplearon dos solventes para retirar la resina de los cortes.

### **Plastisolve**

Se aplicaron unas gotas de Plastisolve (cloridio de metileno) durante 5, 10, 15, 30 y 60 min sobre los cortes semifinos montados en un portaobjetos, se secaron al aire libre. Se recortó el portaobjetos con un lápiz con punta de diámetro conservando tan sólo la zona en donde se localizaron los cortes y se cubrieron con oro (ver cubierta metálica abajo).

### **Metóxido de sodio**

Se preparó el metóxido de sodio con una solución saturada de hidróxido de sodio (NaOH) en etanol al 96°. Se aplicaron unas gotas de este reactivo sobre los cortes semifinos montados durante 5 minutos, se lavaron con etanol al 96° y con alcohol al 100% dejando secar en una estufa a 30 °C , se cubrieron con oro (ver cubierta metálica abajo).

## ▪ SOBRE ACETOLISIS

Se modificó la técnica de acetólisis según Erdtman (1952), se adicionó después de la inhibición de la mezcla acetólítica y lavado de la muestra con ácido acético glacial, un tiempo extra de 10 minutos en hidróxido de potasio al 5 %, se prosiguió con los tres



lavados con agua destilada, con sus respectivas centrifugaciones a 6000 r.p.m., de cinco minutos cada vez.

El polen así tratado se denominó sobreacetolizado, se deshidrató (ver deshidratación abajo), se seco con la técnica de secado de punto crítico (ver secado de punto crítico abajo) y se cubrió con oro (ver cubierta metálica abajo).

### **Deshidratación**

Las muestras de polen fueron deshidratadas con alcoholes graduales de etanol al 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°, realizando cada cambio de alcohol después de 10 minutos.

### **Secado por punto crítico**

Las muestras de polen deshidratadas se secaron con la técnica de secado de punto crítico, con un equipo para secado por punto crítico modelo Samdri-780 A del Instituto de Geología, UNAM, otro modelo SPI-DRY 1250 de la Facultad de Medicina, UNAM y el modelo Samdri-780 A del Colegio de Postgraduados, esta técnica se describe a continuación:

Se tomó una muestra del polen acetolizado deshidratado y se virtió en un sobre de papel filtro no. 1. Los sobres sellados y debidamente etiquetados se llevaron a la cámara de secado del desecador de punto crítico manteniendo siempre húmeda la muestra. Previamente se enfrió la cámara hasta 0°C, se cerró la cámara, con las muestras y se llenó con CO<sub>2</sub> líquido. Se realizó la substitución del alcohol por CO<sub>2</sub> líquido. Para llegar al punto crítico del CO<sub>2</sub> se elevo la temperatura y la presión en la cámara de secado aproximadamente a 31°C y 1073 lb/ pulg<sup>2</sup>, manteniendo estas condiciones por espacio de 6 minutos. Al regresar la muestra a las condiciones ambientales normales, se montó en un portamuestras metálico, sobre una cinta adhesiva de carbón.

### **Cubierta metálica**

La muestra desecada se sombreó con una capa de oro, utilizando una ionizadora EMS563 modelo 7000 de la Facultad de Medicina, modelo JEOL JFC-1100 del Instituto de Geología, UNAM y del Colegio de Postgraduados, durante cinco minutos, aplicando una corriente de 1200 v.

### Observación

El polen de *Phaseolus pauciflorus* se observará en un microscopio de barrido modelo DSM950 de Zeiss, en la Facultad de Medicina, el resto de las especies se examinarán en un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL- JSM-35 C en el Instituto de Geología, y un microscopio electrónico de barrido Hitachi modelo 2460-N en el Instituto de Biología, UNAM.

### Registro de las imágenes

Las imágenes se registraron en película de 35 mm, Ilford, Pan F-Plus, ISO 50 en 4x5 pulgadas y 75 mm.

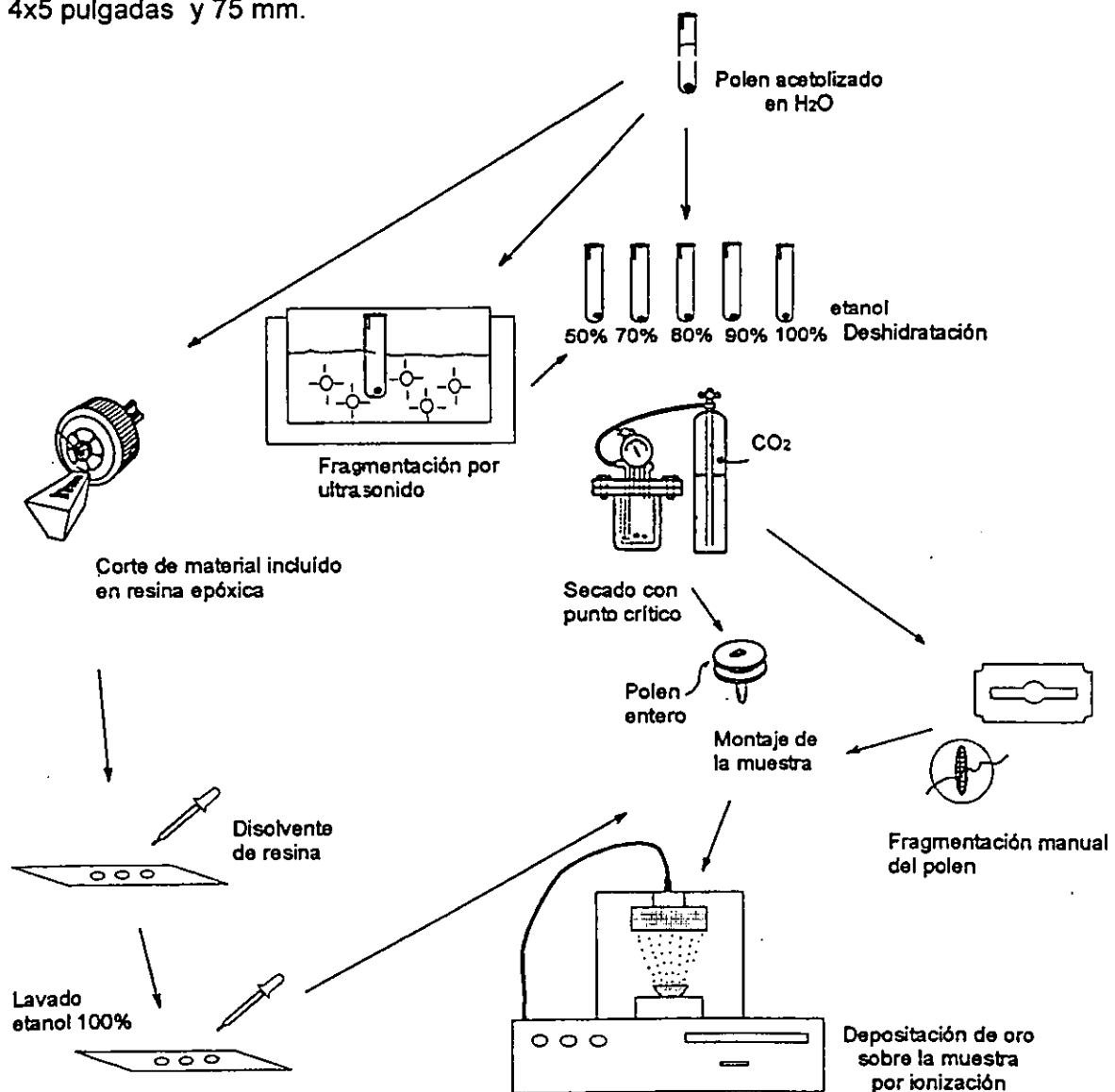


Figura 6. Preparación de polen entero y fragmentado para su observación en el microscopio electrónico de barrido

## RESULTADOS

### Obtención de las medidas

Las mediciones de la exina se realizaron con microscopía fotónica, las de ornamentación y las de aperturas con microscopía de barrido, mientras que el análisis de la estructura con microscopía electrónica de transmisión y barrido.

Para la caracterización de las estructuras en microscopía fotónica se siguió el sistema de clasificación de Erdtman (1952), para estructura del tectum y aperturas el de Punt *et al.* (1994) y para cortes de transmisión y barrido el de Faegri & Iversen (1956).

### MÉTODOS APLICADOS EN ESTE TRABAJO

#### Microscopía Electrónica de Transmisión

Tanto el polen fijado con glutaraldehído al 2.5 % como el fijado con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% aparentemente se conserva en forma similar.

Se obtienen mejores resultados cuando el polen es procesado en estado libre, ya que el medio de resuspensión puede interferir con la penetración y polimerización de la resina.

Al realizar la preinclusión, se detectó que una preinclusión lenta permite una mejor penetración de la resina, independientemente del tipo de resina (en nuestro caso del tipo epóxicas).

#### Microscopía Electrónica de Barrido

##### Material entero

Se ha cuestionado el uso de la técnica de acetólisis para la observación de la superficie del polen debido a las supuestas alteraciones a nivel estructural que este tratamiento puede generar sobre la muestra; sin embargo estudios de composición de la exina han revelado que está presenta un material sumamente resistente al tratamiento bajo esta técnica (Brooks & Shaw 1978; Hemsley *et al.* 1993).

Es un hecho que para ciertos tipos de polen el empleo de la técnica de acetólisis es indispensable. Por un lado por razones de operación del microscopio electrónico, ya que el polen kit y la trifina absorbe energía del cañon de electrones y la muestra se carga o se quema, lo que impide que se genere una imagen óptima y por otro lado quizá más

importante ayuda a realizar interpretaciones correctas de los detalles de las microornamentaciones (microporos, microretículas, microverrugas, microgránulos, etc.) o bien de otra índole (el polen kit y la trifina en ciertos grupos se encuentra en grandes cantidades y enmascara la superficie de la exina).

En nuestro caso se decidió observar el material acetolizado para preveer estas inconveniencias.

### **Material Fragmentado**

Una alternativa para el análisis de la exina con microscopía electrónica de transmisión, es la observación de polen fragmentado con microscopía electrónica de barrido. Para estos fines se han desarrollado una serie de metodologías que en ciertos grupos de plantas son exitosas (Blackmore & Dickinson 1981; Hideux & Marceau 1972).

Durante este trabajo se probaron consecutivamente varias metodologías debido al poco éxito en la obtención de muestras.

Al aplicar la técnica de ultrasonido primero con intensidad ligera (sonicador de baño) y posteriormente con intensidad más agresiva (sonicador de punta), el material permaneció intacto. Ya que en la técnica de ultrasonido realmente la intensidad de ultraviibración es el factor principal para la ruptura de la exina, se decidió probar otras técnicas de ruptura.

Se prosiguió a aplicar la técnica de cortes semifinos, la cual debido a la falta de disolución de la resina (pese a que se aplicaron dos disolventes) no fue óptima, por lo tanto se descartó para nuestro estudio.

Por otro lado la técnica de sobreacetólisis aunque exitosa en el corte, implicaba un manejo minucioso de la muestra fragmentada, la cual al deshidratarse se fue perdiendo y además al final fue imposible controlar su procedimiento (zona de origen apartir del polen entero).

Finalmente se obtuvo mayor éxito con la técnica de corte libre, la cual aunque resulta laboriosa proporciona los datos de referencia de la zona de corte.

Si bien esta última técnica presenta la gran ventaja de conservar sin alteración química alguna el material, tiene como limitante la extensión temporal y necesidad de contar con abundante material, ya que el porcentaje de obtención de cortes útiles es muy baja.

### **Análisis de la Estructura de la Exina con Microscopía Electrónica**

El MET indudablemente proporciona una mayor resolución de la estructura de la exina, sin embargo la aparición de columelas irregulares puede generar interpretaciones erróneas, cuando los cortes de la exina se realizan con diferentes orientaciones del polen. En consecuencia los cortes observados en MEB se corroboraron y/o confirmaron la existencia de éstas; así como la de estructuras granulares ordenadas que en MET parecían columelas o viceversa.

Por lo anterior en este trabajo se sugiere emplear ambas metodologías o en su defecto realizar cortes desde diferentes orientaciones con MET, como otros autores han propuesto.

## Descripciones Palinológicas

### SECCION PHASEOLUS DC.

#### 1. *Phaseolus leptostachyus* Bentham

##### **AperturaS** (lám. 1, fig. 2, lám. 2, fig.5)

Granos tricolporados con grandes ectoaperturas (comparado con el tamaño longitud ecuatorial de la ectoapertura).

**Ectoapertura** de  $30.16 \pm 2.37 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $14.125 \pm 2.82 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial, bordeada por un margo grueso, **margo** psilado a estriado-rugulado en sus ápices, de  $2.0-4.66 \mu\text{m}$  de grosor, **escotadura** interna del margo de aguda a ligeramente redondeada.

**Membrana colp** con gránulos dispuestos sobre todo en los extremos de las escotaduras internas del margo.

**Endoapertura** corresponde a un poro circular a ligeramente alargado de  $12.83 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $11.58 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial.

##### **ESTRUCTURA**

Semitectado (lám.7, fig.1-2).

**Apocolpio** (lám.2, fig. 6-9-). Analizando la estructura en MEB rugulado a foveolado, **rúgulas y foveolas**  $1.0-4.0 \mu\text{m}$  de largo y de  $1.0-1.5 \mu\text{m}$  de ancho.

**Zonas intectadas** con o sin gránulos.

**Mesocolpio**(lám. 2 ,fig. 1-4). Analizando la estructura en MEB irregularmente rugulado a foveolado, **rúgulas** de  $0.83-1.38 \mu\text{m}$  de ancho o largo.

**Zonas intectadas** regularmente con gránulos, rara vez sin gránulos.

**Inmediaciones del limes** (lám. 2, fig. 1-4) (límite externo de la ectoapertura o colpo) con una estructura que tiende a ser intectada, en la zona ecuatorial del mesocolpio (cerca de las aperturas).

**EXINA**

**Exina** de  $2.6 \pm 0.64 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y  $2.44 \pm 0.64 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**Sexina** de  $0.85 \pm 0.20 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $0.72 \pm 0.2 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**Nexina** de  $1.81 \pm 0.44 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $1.71 \pm 0.43 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**ESTRATIFICACION** (lám. 7, fig. 1-2)

Con base en la información de los cortes del polen en MET y MEB presenta una **Exina** subtectada.

**Tectum** de  $0.5-0.77 \mu\text{m}$  de grosor.

**Infractum** granular, **gránulos** irregulares en tamaño, los de la zona intectada más grandes y los por debajo de las zonas tectadas más pequeños entre  $0.05 - 0.2 \mu\text{m}$ , de esta manera la estructura corresponde a una forma granular desordenada, en algunas zona granular orientada.

**Endexina** de  $0.7-1.6 \mu\text{m}$  de grueso.

**INDICE POLAR**

I.P. = 0.25

**TAMAÑO Y FORMA**

AMB circular a semiangular. Prolado esferoidal. Granos de polen largos.

P/E x 100 = 103.9.

**ASOCIACION**

Eumonadas

**MEDIDAS DE LAS ESTRUCTURAS**

	X ( $\mu\text{m}$ )	Rango ( $\mu\text{m}$ )	Desviación típica	Coefficiente de variación
Eje polar	63.34	15	4.66	7.35
Eje ecuatorial	61.38	22	6.53	10.63
Longitud polar de la ectoapertura	30.16	7	2.38	7.89
Longitud ecuatorial de la ectoapertura	14.13	5	2.82	10.95
Longitud polar del poro	12.83	6	2.10	16.36
Longitud ecuatorial del poro	11.58	4	2.44	21.07
Ancho margo	4	2	0.70	17.5

	X ( $\mu\text{m}$ )	Rango ( $\mu\text{m}$ )	Desviación típica	Coefficiente de variación
Grosor sexina en zonas tectadas	0.85	1.5	0.2	23.52
Grosor nexina en zonas intactadas	1.81	3	0.44	24.30
Sexina en zonas tectadas	0.27	1	0.02	7.40
Nexina en zonas intactadas	1.71	3	0.44	25.73

## COMENTARIOS

En vista ecuatorial un 47.62% del eje polar esta cubierta por la longitud polar de la ectoapertura, y de la longitud polar de la ectoapertura un 42.52 % lo ocupa el poro. Con respecto al diámetro ecuatorial un 23% la ocupa la longitu ecuatorial de la ectoapertura y de esta un 82.01% lo cubre la longitud ecuatorial del poro.

La nexina es más gruesa que la sexina, tanto en los muros como en el lumen, ocupa un 67.80 % del grueso de la exina en el muro, mientras que en el lumen un 70.37%.



## SECCION MINKELERSIA (Mart.& Gal.) Maré., Masch. & Stain.

### 2. *Phaseolus pauciflorus* Sessé & Mociño ex G. Don

**AperturaS** (lám. 1, fig.4, lám. 3-4, fig. 5)

Granos tricolporados con grandes ectoaperturas.

**Ectoapertura** de  $43.9 \pm 3.38 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $31.18 \pm 3.34 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial, bordeada por un margo grueso, **margo** psilado interrumpido en algunas zonas, de  $3.8-4.0 \mu\text{m}$  de grueso, **escotadura** interna del margo de redondeada a aguda, ocasionalmente uno de los ápices del margo en una de las ectoaperturas se proionga y forma una valla muy larga que llega al apocolpio.

**Membrana colpal** con gránulos dispuestos sobre todo en los extremos de las escotaduras internas del margo.

**Endoapertura** corresponde a un poro casi circular a ligeramente alargado, de  $25.6 \pm 1.84 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $26 \pm 4.71 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial.

#### ESTRUCTURA

Semitectado (lám. 7, fig. 3-4)

**Apocolpio** (lám. 3-4, fig. 6-9). Analizando la estructura en el MEB verrugado a rugulado, **rugas y verrugas** se encuentran densa a laxamente dispuestas, gruesas a delgadas, de  $2.46 - 13.99 (16.16) \mu\text{m}$  de largo y de  $1.36 - 2.94 (4.02) \mu\text{m}$  de ancho.

**Mesocolpio** (lám. 3-4, fig.1-5). Analizando la estructura en el MEB verrugado, ocasionalmente algunas de las verrugas se unen por sus extremos y forman pequeñas retículas a rúgulas, **verrugos y rúgulas** uniformemente dispuestas sobre todo en la parte media del mesocolpio sin llegar al limes, de  $(0.59)1 - 3(3.57) \mu\text{m}$  de largo y de  $(2.53)2.68 - 9.54 (16.15) \mu\text{m}$  de ancho.

**Zonas intectadas** tanto en apocolpio como en mesocolpio con gránulos.

**Inmediaciones del limes** con una estructura intectada.

**EXINA**

**Exina** de  $4.23 \pm 0.74 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y  $2.94 \pm 0.6 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**Sexina** de  $0.85 \pm 0.20 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $0.72 \pm 0.44 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas

**Nexina** de  $1.81 \pm 0.44 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $0.72 \pm 0.20 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**ESTRATIFICACION**

Con base en la información de los cortes del polen en MET y MEB presenta una

**Exina** subtectada.

**Tectum** de  $0.3\text{-}0.5 \mu\text{m}$  de grosor.

**Infratectum** granular, **gránulos** irregulares en tamaño, los de la zona tectada de  $0.07\text{-}0.1 \mu\text{m}$ , de esta manera la estructura corresponde a una estructura granular desordenada

**Endexina** de  $0.4\text{-}0.7 \mu\text{m}$  de grueso.

**INDICE POLAR** 0.710

**TAMAÑO Y FORMA**

AMB semiangular. Prolado esferoidal. Granos largos.  $P/E \times 100 = 97.59$

**ASOCIACION**

Eumonadas

**MEDIDAS DE LAS ESTRUCTURAS**

	X ( $\mu\text{m}$ )	Rango ( $\mu\text{m}$ )	Desviación típica	Coefficiente de variación
Eje polar	84.63	18	6.36	7.51
Eje ecuatorial	86.72	11	5.51	6.35
Longitud polar de la ectoapertura	43.9	11	3.38	7.69
Longitud ecuatorial de la ectoapertura	31.18	11	3.34	10.71
Longitud polar de la ectoapertura	25.6	4	1.84	7.19
Longitud ecuatorial de la ectoapertura	26	17	4.71	18.11
Ancho margo	11.58	4	2.44	21.07
Grosor sexina en zonas tectadas	2.14	3	0.45	21.02
Grosor nexina en zonas intectadas	2.09	3	0.38	18.18
Sexina en zonas tectadas	0.96	2	0.24	25.52
Nexina en zonas intectadas	1.98	2.5	0.36	18.18

**COMENTARIOS**

En vista ecuatorial un 51.87% del eje polar está cubierta por la longitud polar de la ectoapertura, y de la longitud polar de la ectoapertura un 58.31 % lo ocupa el poro. Con respecto a la longitud ecuatorial un 35.95% la ocupa la ectoapertura y en está un 83.39% lo cubre el poro.

La nexina es más gruesa que la sexina sólo en el lumen, ocupa un 49.40% del grueso de la exina en el muro, mientras que en el lumen un 67.34%.

### 3. *Phaseolus pluriflorus* Maré., Masch. & Stain.

**AperturaS** (lám. 1, fig. 6, lám. 5, fig. 5)

Granos tricolporados con brevicolpos.

**Ectoapertura** de  $28.83 \pm 2.34 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $11.30 \pm 1.25 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial, margo no engrosado, margo se define por un cambio gradual de la estructura del tectum, las retículas se transforman a foveolas hasta formar una zona psilada, que es el margo, de  $2-3 \mu\text{m}$  de grosor, **escotadura** interna del margo de redondeada a aguda.

**Membrana colpal** con gránulos dispuestos sobre todo hacia los extremos de las escotaduras internas del margo.

**Endoapertura** corresponde a un poro alargado, de  $13.71 \pm 1.81 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $9.38 \pm 1.61 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial.

#### **ESTRUCTURA**

Semitectado (Lám. 7, fig. 5-6)

**Apocolpio y mesocolpio** (lám. 1, fig. 5, lám. 5, fig. 1-4, 6-9). Analizando la estructura en MEB heterobrocado, reticulado a microreticulado, algunas veces microfoveolado, **retículas** de  $(1.55) 2.06 - 7.74 \mu\text{m}$  de largo y de  $0.53 - 1.21 (1.55) \mu\text{m}$  de ancho.

**Zonas intectadas** con gránulos.

**Limes** no definido.

#### **EXINA**

**Exina** de  $2.75 \pm 0.57 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y  $2.5 \pm 0.56 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**Sexina** de  $1.25 \pm 0.30 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $0.95 \pm 0.26 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**Nexina** de  $1.5 \pm 0.27 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $1.55 \pm 0.32 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**ESTRATIFICACION** (lám. 7, fig 5-6)

Con base en la información de los cortes del polen en MEB presenta una **Exina** subtectada.

**Tectum** de 0.3-0.6  $\mu\text{m}$  de grosor.

**Infratectum** granular, **gránulos** irregulares en tamaño, los de las zonas tectadas de 0.05-0.15  $\mu\text{m}$  de grueso. En las zonas intectadas ocasionalmente se presentan baculas muy irregulares, de 0.4-1.1  $\mu\text{m}$  de alto y 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  de ancho, de esta manera la estructura corresponde a una forma granular desordenada a nivel de tectum y granular con baculado a nivel del lumen.

**Endexina** de 0.5-0.6  $\mu\text{m}$  de grueso.

**INDICE POLAR**

$$I.P. = 0.777$$

**TAMAÑO Y FORMA**

Prolado esferoidal, granos largos.  $P/E \times 100 = 102.97$

**ASOCIACION**

Eumonadas

**MEDIDAS DE LAS ESTRUCTURAS**

	X ( $\mu\text{m}$ )	Rango ( $\mu\text{m}$ )	Desviación típica	Coefficiente de variación
Eje polar	71.14	20	5.91	8.30
Eje ecuatorial	69.09	21	3.68	5.32
Longitud polar de la ectoapertura	28.83	7	2.35	8.15
Longitud ecuatorial de la ectoapertura	11.30	4	1.25	11.06
Longitud polar del poro	13.71	6	1.81	13.20
Longitud ecuatorial del poro	11.30	3	1.60	14.16
Ancho margo	3.80	3	1.03	27.10
Grosor sexina en zonas tectadas	1.25	2	0.3	24
Grosor nexina en zonas tectadas	1.5	1.5	0.32	21.33
Sexina en zonas intectadas	0.95	2	0.24	25.26
Nexina en zonas intectadas	1.55	1.5	0.27	17.41

## **COMENTARIOS**

En vista ecuatorial un 40.48% del eje polar esta cubierta por la longitud polar de la ectoapertura, y de la longitud polar de la ectoapertura un 47.60 % lo ocupa el poro. Con respecto a la longitud ecuatorial un 16.37% la ocupa la ectoapertura y en ésta un 82.94% lo cubre el poro.

La nexina es más gruesa que la sexina, esto es más evidente en el lumen, ya que ocupa un 54.54% del grueso de la exina en el muro, mientras que en el lumen un 62%.

## SECCION XANTHOTRICHII A. Delgado

### 4. *Phaseolus zimapanensis* A. Delgado sp. nov.

**AperturaS** (lám. 1, fig. 8, lám. 6, fig. 5) Granos tricolporados con brevicolpos.

**Ectoapertura** de  $27.88 \pm 2.94 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $14.33 \pm 4.27 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial, bordeada por un margo, **margo** psilado con algunas estrias a todo su largo, de  $3.3 \pm 0.57 \mu\text{m}$  de grueso, **escotadura** interna del margo redondeada.

**Membrana colpal** membrana colpal con gránulos dispuestos sobre todo hacia los extremos de las escotaduras del margo como en el limes del poro.

**Endoapertura** corresponde a un poro alargado, de  $10.38 \pm 2.6 \mu\text{m}$  de longitud polar y de  $8.29 \pm 1.8 \mu\text{m}$  de longitud ecuatorial.

#### ESTRUCTURA

Semitectado.

**Apocolpio** (lám. 1, fig. 7, lám. 6, fig. 6-9). Analizando la estructura en MEB se presenta una gran diversidad, con tectum foveolado y retículos con tendencia a rugulados, **retículas** de  $1.79 - 6.24 \mu\text{m}$  de largo y de  $(0.66) 1 - 2.65 \mu\text{m}$  de ancho.

**Zonas intectadas** con o sin gránulos.

**Mesocolpio.** Analizando la estructura en MEB reticulado a foveolado, **retículas** son grandes de  $2.81 - 5.96 (6.49) \mu\text{m}$  de largo y de  $0.5 - 1.33 (3.32) \mu\text{m}$  de ancho.

**Zonas intectadas** regularmente con muchos gránulos, rara vez sin gránulos.

El número de las retículas varía entre la zona del apocolpio y del mesocolpio, siempre más en el apocolpio.

Otras poblaciones pueden presentar las siguientes características:

**Apocolpio** (lám. 1, fig. 7, lám. 6, fig. 6-9) rugulado a foveolado, entonces con rugas más gruesas.

**Mesocolpio** (lám. 6, fig. 1-4) rugulado muy cerrado a foveolado.

**Inmediaciones del limes** (lám. 6, fig. 1-4) intectado, sobre todo en zona ecuatorial (en vista ecuatorial) cerca de la apertura.

**EXINA**

**Exina** de  $2.41 \pm 0.95 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $1.86 \pm 0.47 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**Sexina** de  $0.97 \pm 0.56 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $0.47 \pm 0.08 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**Nexina** de  $1.44 \pm 0.39 \mu\text{m}$  de grueso en zonas tectadas y de  $1.39 \pm 0.39 \mu\text{m}$  de grueso en zonas intectadas.

**ESTRATIFICACION** (lám. 7, fig. 7-8)

Con base en la información de los cortes del polen en MET y MEB se presenta una:

**Exina** subtectada.

**Tectum** de  $0.4-0.77 \mu\text{m}$  de grosor.

**Infratectum** granular, **gránulos** de las zonas tectadas pequeños entre  $0.09-0.2 \mu\text{m}$ , ocasionalmente en las zonas intectadas se encuentran baculas, de  $0.2-0.45 \mu\text{m}$  de ancho y de  $0.8-0.9 \mu\text{m}$  de alto, aunque en las zonas tectadas parecen presentarse columelas, los cortes al MEB evidencian la orientación y superposición de los gránulos, de esta manera la estructura corresponde a una forma granular ordenada y no así de columelas con granulos en la zonas intectadas y granular ocasionalmente con baculas en las zonas intectadas.

**Endexina** de  $0.54 - 0.89 \mu\text{m}$  de grueso.

**INDICE POLAR**

$$\text{I.P.} = 0.7456$$

**TAMAÑO Y FORMA**

AMB circular a semiangular. Prolado esferoidal. Granos largos.

$$P/E \times 100 = 101.26.$$

**ASOCIACION**

Eumonadas

**MEDIDAS DE LAS ESTRUCTURAS**

	X ( $\mu\text{m}$ )	Rango ( $\mu\text{m}$ )	Desviación típica	Coefficiente de variación( %)
Eje polar	61.88	19	9.68	15.64
Eje ecuatorial	61.11	32	10.67	17.46
Longitud polar de la ectoapertura	27.87	6	2.94	10.54
Longitud ecuatorial de la ectoapertura	10.37	7	4.27	0.41



	X ( $\mu\text{m}$ )	Rango ( $\mu\text{m}$ )	Desviación típica	Coefficiente de variación( %)
Longitud polar del poro	14.33	5	2.61	18.21
Longitud ecuatorial del poro	8.28	5	1.79	21.61
Ancho margo	3.33	1	0.57	17.11
Grosor de sexina en zonas tectadas	0.97	1.5	0.56	0.57
Grosor de Nexina en zonas tectadas	1.44	2.0	0.39	27.08
Sexina en zonas intectadas	0.47	0.5	0.08	17.02
Nexina en zonas intectadas	1.39	0.5	0.39	28.05

## COMENTARIOS

En vista ecuatorial un 45.05% del eje polar esta cubierta por la longitud polar de la ectoapertura, y de la longitud polar de la ectoapertura un 37.23% lo ocupa el poro. Con respecto a la longitud ecuatorial un 23.45% la ocupa la ectoapertura y en está un 57.78% lo cubre el poro.

La nexina es más gruesa que la sexina, tanto en los muros como en el lumen, ocupa un 59.75% del grosor de la exina en el muro, mientras que en el lumen un 74.73%.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

### Tamaño

Con base en la clasificación de Erdtman (1952) los granos de polen de las especies aquí estudiadas son grandes, siendo en orden ascendente los de *Phaseolus leptostachyus*, *P. zimapanensis*, *P. pluriflorus* y *P. pauciflorus* los más grandes. Con respecto a los datos de tamaño para las especies del género proporcionada por Delgado-Salinas (1985) las de este trabajo se ubican como las más grandes, entre 61-84  $\mu\text{m}$ .

Al considerar los valores de las desviación estandar del tamaño observamos que los valores pueden coincidir al menos en los valores extremos del rango de variación de sus dimensiones, es decir es un caracter variable, que no distingue a las especies aquí estudiadas.

### Forma

Pese a que Delgado-Salinas (1985) indica que la forma predominante en el género es la esférica a oblado-esferoidal y rara vez la subprolada, las cuatro especies estudiadas en este trabajo presentan la forma prolado-esferoidal.

### Estructura de la exina

Maréchal *et al.* (1978), Horvat (1978) y Stainier y Horvat (1978, 1983) señalan que la exina del polen del género *Phaseolus* presenta una estructura columelar (*P. ritensis*, Stainier & Horvat 1978); sin embargo Delgado-Salinas (1985) indica que aunque es una característica común de *Phaseolus*, no es distintiva, ya que en un estudio realizado anteriormente por Delgado-Salinas *et al.* (1982), *P. chiapasanus* presentó una estructura granular.

Los resultados obtenidos revelan que *Phaseolus* se caracteriza por su estructura columelar, estructura granular y además en algunas especies como *P. pluriflorus* y *P. zimapanensis* con una estructura granular en las zonas tectadas y ocasionalmente con baculas y granular en las zonas intectadas, esta última estructura reportada por vez primera en el género (cuadro 5).

Si bien los tipos de estructuras aquí descritos son específicos para cada especie, se requiere de un mayor muestreo antes de generalizar los tipos de estructura característicos de las secciones.

Los datos obtenidos cuestiona el valor taxonómico de la estructura de la exina para definir los géneros *Vigna* y *Phaseolus* como propone Maréchal *et al.* (1978), debido a que ambos presentan una gran variación de tipos estructurales de la exina.

Taxa		Estructura
P h o s e o l i s	<i>P. nitensis</i> (Stainier & Horvat 1978)	columelar
	<i>P. chapasanus</i> (Ueigado Sainas <i>et al.</i> 1982)	granular
	<i>P. leptostachyus</i>	
	<i>P. pauciflorus</i>	
	<i>P. pluriflorus</i>	granular en las zonas tectadas y ocasionalmenmte con báculas y gránulos en las zonas tectadas
<i>P. zimapanensis</i>		

**Cuadro 5.** Estructura de la exina presentes en el género *Phaseolus* conocida hasta el momento.

### Endexina y Capa basal

En las cuatro especies la endexina, se encuentra bien desarrollada, lo que concuerda con una de las tendencias de la subfamilia según Ferguson & Skvarla (1981). Es decir perder la capa basal y desarrollar considerablemente la endexina.

### Exina y aperturas

Guinet (1981) y Guinet & Ferguson (1989) señalan que en las Leguminosas existe una relación entre los caracteres de la exina y los tipos aperturales de tal forma, que si la endexina se encuentra bien desarrollada aparentemente la ectexina disminuye y viceversa; mientras que una endexina reducida en aperturas compuestas, influye en la desaparición de la parte de la apertura localizada en la endexina, es decir la endoapertura.

Ya que las mediciones de las capas de la exina se realizaron con ayuda de la microscopía fotónica, los datos obtenidos de sexina y nexina en zonas tectadas y zonas intectadas, permitieron un análisis indirecto del desarrollo de la endexina y ectexina.

Por la relación entre las capas de la exina y aperturas se agrupan *Phaseolus pauciflorus* y *P. leptostachyus* con la sexina más gruesa tanto en zonas tectadas como zonas intectadas, y *P. zimapanensis* y *P. pluriflorus* con la sexina más delgada tanto en zonas tectadas como en zonas intectadas. El grosor de la sexina como Guinet (1981) señala al nivel de la ectexina también presenta una relación inversamente proporcional a la longitud polar de las aperturas (cuadro 6)

Taxa	Sexina grosor	Nexina	Ectoapertura	Endoapertura
<i>P. pauciflorus</i> <i>P. leptostachyus</i>	grueso	delgada	grandes (longitud polar grande), bordeadas por un margo grueso	longitud polar grande
<i>P. zimapanensis</i> <i>P. pluriflorus</i>	delgada	gruesa	menores (longitud polar chica), sin margo grueso	longitud polar pequeña

Cuadro 6. Relación entre las capas de la exina y aperturas en el género *Phaseolus*

#### Inmediaciones del limes (Pseudocolpo)

Stainier & Horvat (1978) y Stainier & Horvat (1983) describen en el género *Vigna*, zonas aperturales por las diferencias de estructura que se presentan alrededor de apertura, diferenciando dicha área de las zonas no aperturales. Señalan que en las zonas aperturales existe un cambio en las retículas presentándose un retícula paulativamente más pequeña hasta delimitar un anillo que se circunscribe sólo a la ectoapertura.

Un análisis minucioso de la estructura del tectum en el apocolpio y mesocolpio de las especies de *Phaseolus* reveló que dichos pseudocolpos corresponden a zonas del mesocolpio con una estructura diferenciada principalmente en las zonas cercanas a las aperturas (aquí denominada inmediaciones del limes) y a los alrededores del apocolpio.

Aunque Bronkers *et al.* (1972), Stainier (1974) y Marechal *et al.* (1976) mencionan que *Phaseolus* presenta pseudocolpos o sea zonas que sin ser apertura parecen una y que se localiza entre las aperturas verdaderas, la estructura del tectum aquí observada, apuntan que bien podría corresponder a las zonas aperturales y zonas no aperturales que manejan Stainier & Horvat (1978).

De aplicarse esta nomenclatura además de homogenizar los conceptos palinológicos, sería posible interpretar su transformación y variación en diferentes taxa.

En cuanto al tipo de apertura Delgado-Salinas (1985) señala que *P. leptostachyus* presenta un polen triporado, en este trabajo se detectó la presencia de una ectoapertura claramente definida con un margo, por lo que se debe describir como un grano colporado con brevicolpos.

Por otro lado, existen dos caracteres que pudieran ser útiles para la diferenciación de los grupos polínicos del género: membrana de la ectoapertura (caracter que ya había sido mencionado por Delgado-Salinas (1985)) y forma de la escotadura interna de la ectoapertura.

### **Margo**

Un caracter exclusivo y particular de cada especie, es el margo, que es todo aquel engrosamiento o cambio de estructura que rodea al colpo, en nuestro caso la ectoapertura.

Por ejemplo en *Phaseolus pauciflorus* se presenta una ectoapertura con un margo bien desarrollado, mientras que en el polen de *P. zimapanesnis*, *P. pluriflorus* y *P. leptostachyus* las ectoaperturas apenas se delimitan por la transición de estructura del tectum.

Aparentemente existe una relación muy fuerte en cuanto al grosor de la exina y la presencia de margo gruesos o sólo diferenciados por un cambio en la estructura como puede observarse en el cuadro 6.

### **Estructura**

En el género *Phaseolus* se presenta un amplio rango de tipos de exina desde tectados a subtectados, finamente perforados a fina o ampliamente reticulado, verrugado y rugulado como señala Delgado Salinas (1985).

En este trabajo además se destaca que es posible diferenciar la estructura del tectum en el apocolpio y mesocolpio, en las inmediaciones de las aperturas o inmediaciones del limes y aun más variaciones de la estructura del tectum en el margo (cuadro 7). Estas características ayudan a diferenciar palinológicamente a las especies.

Delgado-Salinas (1985) menciona que la estructura de *P. leptostachyus* es foveolada sin embargo en este estudio se describe como rugulado a foveolado en el apocolpio, irregularmente rugulado a foveolado en el mesocolpio, e intectado en la zona ecuatorial del mesocolpio al limes del margo.

Con respecto a *Phaseolus pauciflorus* este mismo autor señala que en el primero es rugulado sin embargo en este trabajo se describe como verrugado, con las inmediaciones del limes intectadas, con verrugas densamente dispuestas en el mesocolpio y ocasionalmente con una verruga continua que surge de uno de los ápices del margo de una ectoapertura al apocolpio.

Para *Phaseolus pluriflorus* la descripción concuerda con la de Delgado-Salinas (1985), siendo su tectum microreticulado a microfoveolado.

Lo anterior evidencia la necesidad de realizar descripciones más completas de la estructura del tectum en el género, información que indudablemente redundaran en el mejor conocimiento morfológico del género.

### **Sección *Minkelersii***

Debido a que en este estudio se realizaron observaciones de dos especies de una misma sección, fue posible detectar parte de la variación palinológica a nivel de sección y en las mismas especies.

Las diferencias entre las especies de la sección *Minkelersii* básicamente se concentran en sus aperturas y estructura del tectum mientras que sólo comparten algunos aspectos de la estructura de la exina (cuadro 8).

Lo anterior coincide con las diferencias que se presentan en la morfología floral, inflorescencia y hábito (*com. pers.* Delgado-Salinas, 1997). De esta forma las características palinológicas de las especies de la sección aquí estudiadas se suman a las macromorfológicas antes mencionadas para apoyar la división que Delgado-Salinas (1985) propone para la sección *Minkelersii*.

<i>Phaseolus pauciflorus</i>	<i>Phaseolus pluriflorus</i>
Tectum verrugado	Tectum con la retícula heterobrocado
Diferentes patrones del tectum en mesocolpio y apocolpio	Patrones del tectum similares en apocolpio y mesocolpio
Ectoapertura con un margo engrosado	Ectoapertura con un margo poco engrosado distinguiendole por el cambio de estructura
Margo psilado	Margo psilado a esparcidamente perforado
Margo ligeramente interrumpido en algunas zonas	Margo entero

**Cuadro 8.** Diferencias palinológicas entre las especies de la sección *Minkelersii*.

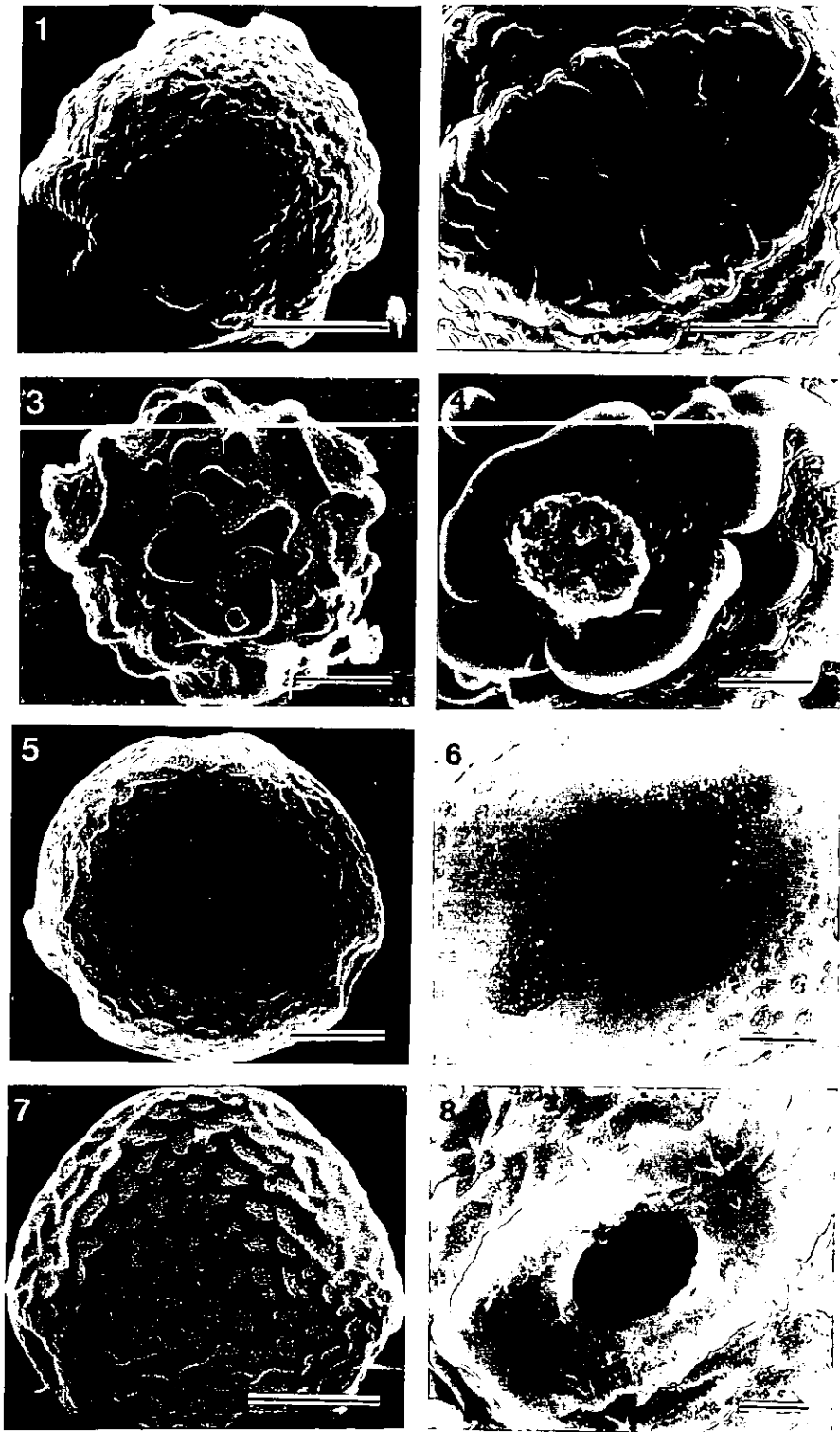
### ***Phaseolus pauciflorus***

Del estudio de las poblaciones de *Phaseolus pauciflorus* geográficamente separadas (norte y centro de la República Mexicana) se observó una variación notable en cuanto al tamaño, forma y estructura del tectum (cuadro 9). Lo anterior permitió establecer una mejor interpretación de la variación palinológica de la especie.

Jalisco	Edo. México
Tectum verrugado, nunca rugulado en el mesocolpio	Tectum verrugado, con verrugas más pequeñas y ocasionalmente rugulado en el mesocolpio
Poros pequeños con respecto a la longitud polar de la ectoapertura	Poros grandes con respecto a la longitud polar de la ectoapertura
Longitud polar de la ectoapertura, corta	Longitud polar de la ectoapertura, larga
Margo de la ectoapertura grueso	Margo de la ectoapertura, delgado

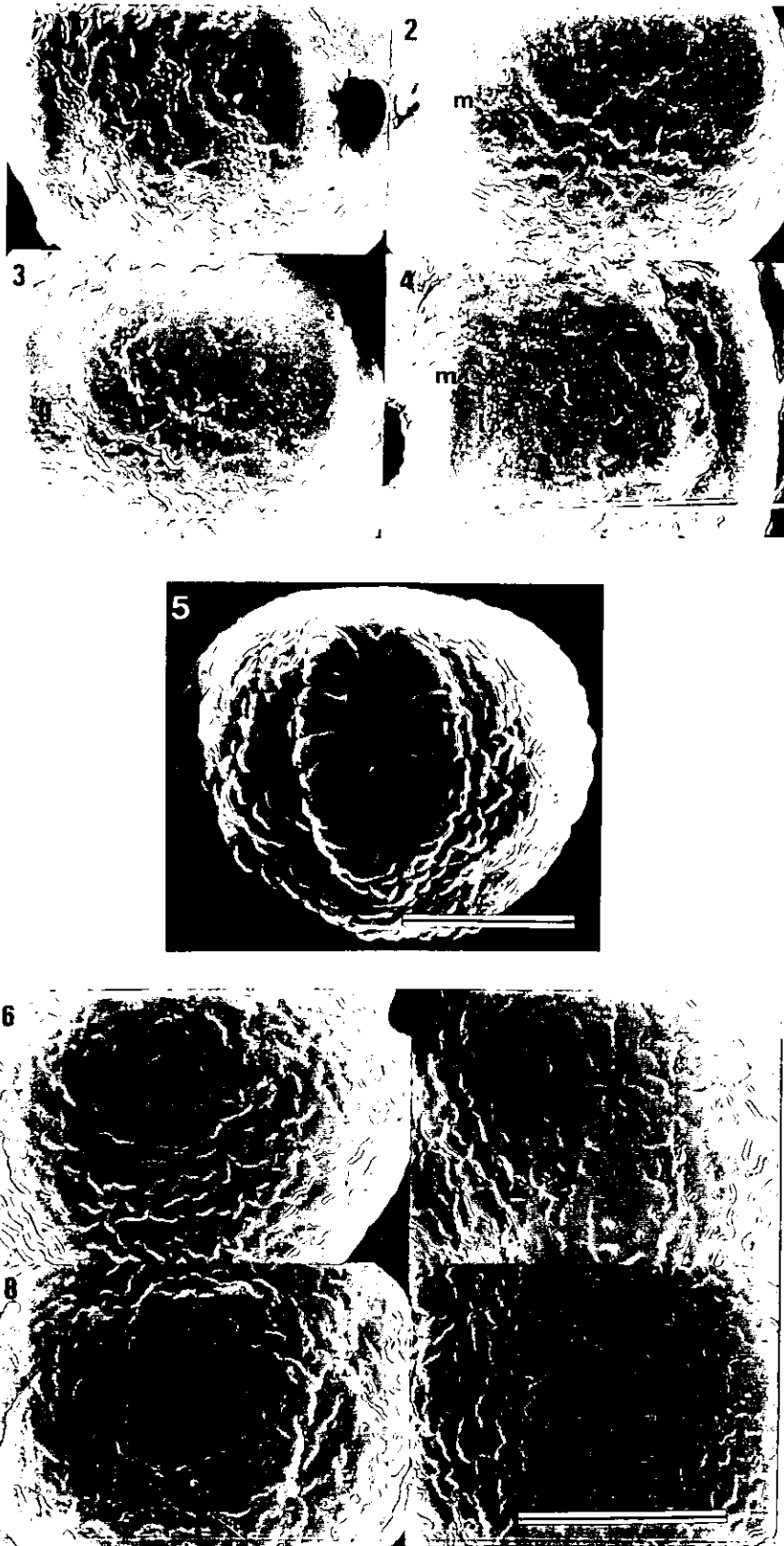
**Cuadro 9.** Diferencias palinológicas entre las poblaciones de *Phaseolus pauciflorus*

En conclusión los datos aportados en este trabajo demuestran que la estructura de *Phaseolus* presenta todos los tipos de estructura conocidas para la familia, es decir desde columelar hasta granular y además granular en zonas tectadas y granular con báculas en zonas intectadas. Así mismo revelan que no es posible establecer por el momento ningún curso de la evolución de la estructura de la exina, es decir no podemos señalar que las columelas son más avanzadas o que los gránulos son más primitivos.

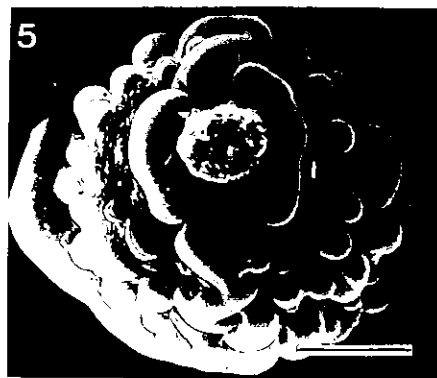


**Lámina 1** *Phaseolus leptostachyus* Fig.1 vista polar 2. abertura. *Phaseolus pauciflorus* 3. vista polar 4. abertura *Phaseolus pluriflorus* 5. vista polar 6. abertura *Phaseolus zimapanensis* 7. vista polar 8. abertura. Barra vista polar= 10 $\mu$ , barra aberturas= 5 $\mu$ m

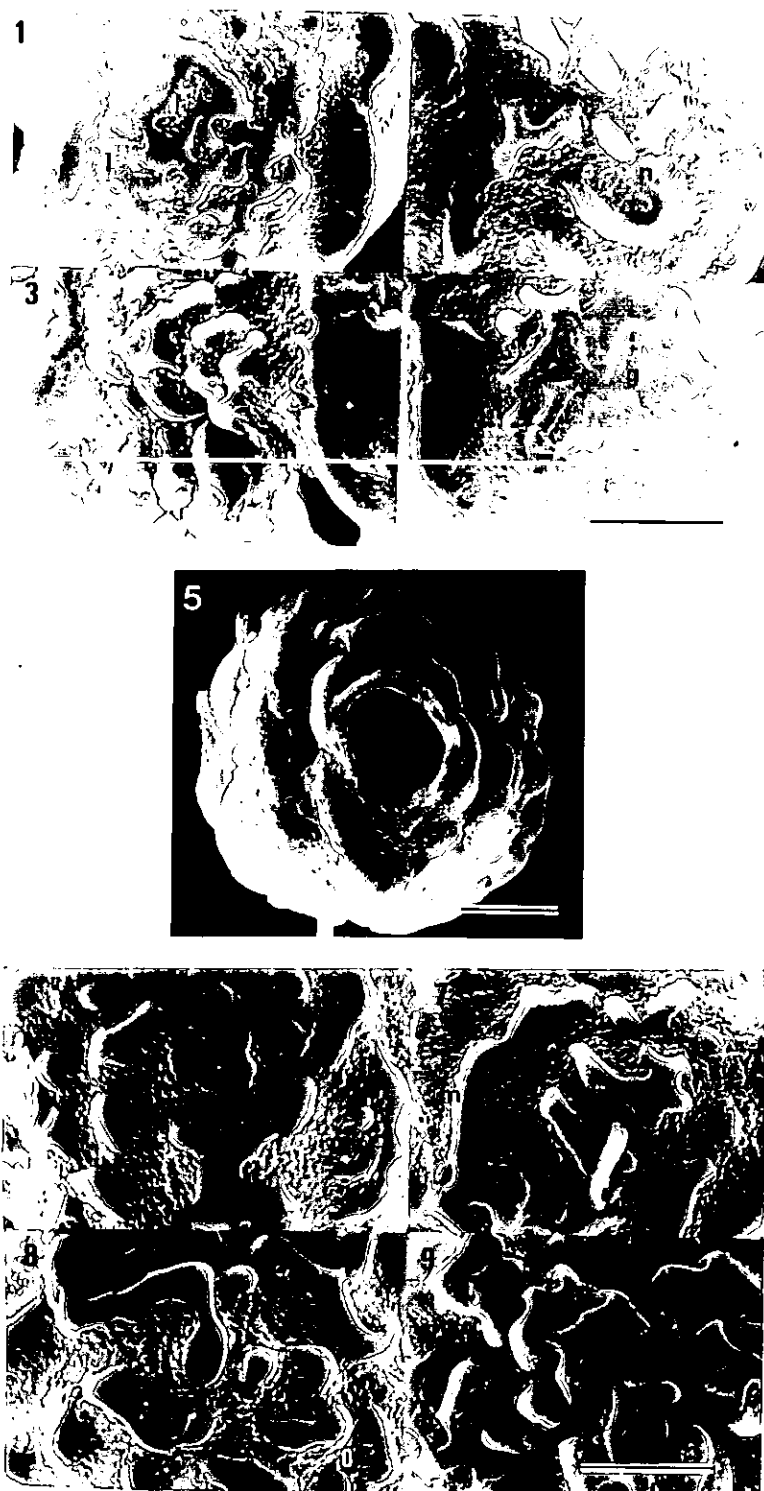




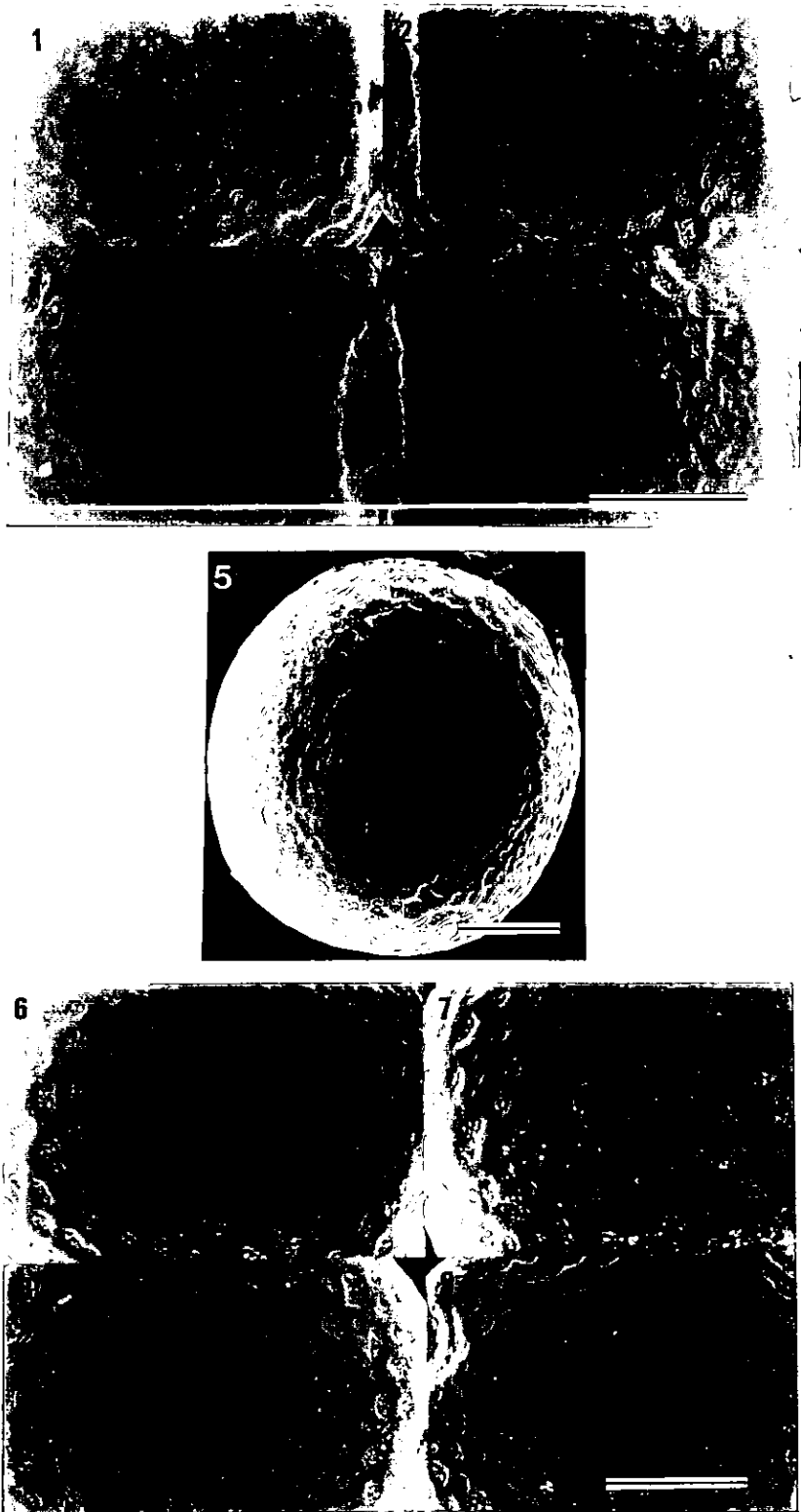
**Lámina 2** *Phaseolus leptostachyus* Fig. 1-4 Variación de la estructura en el mesocolpio. Fig. 5 Vista ecuatorial. Fig. 6-9 Variación de la estructura en el apocolpio. g=gránulos del lumen, m=margó psilado a estriado-rugulado, l= inmediaciones del lumen con estructura intectada. Barra= 10  $\mu$ m



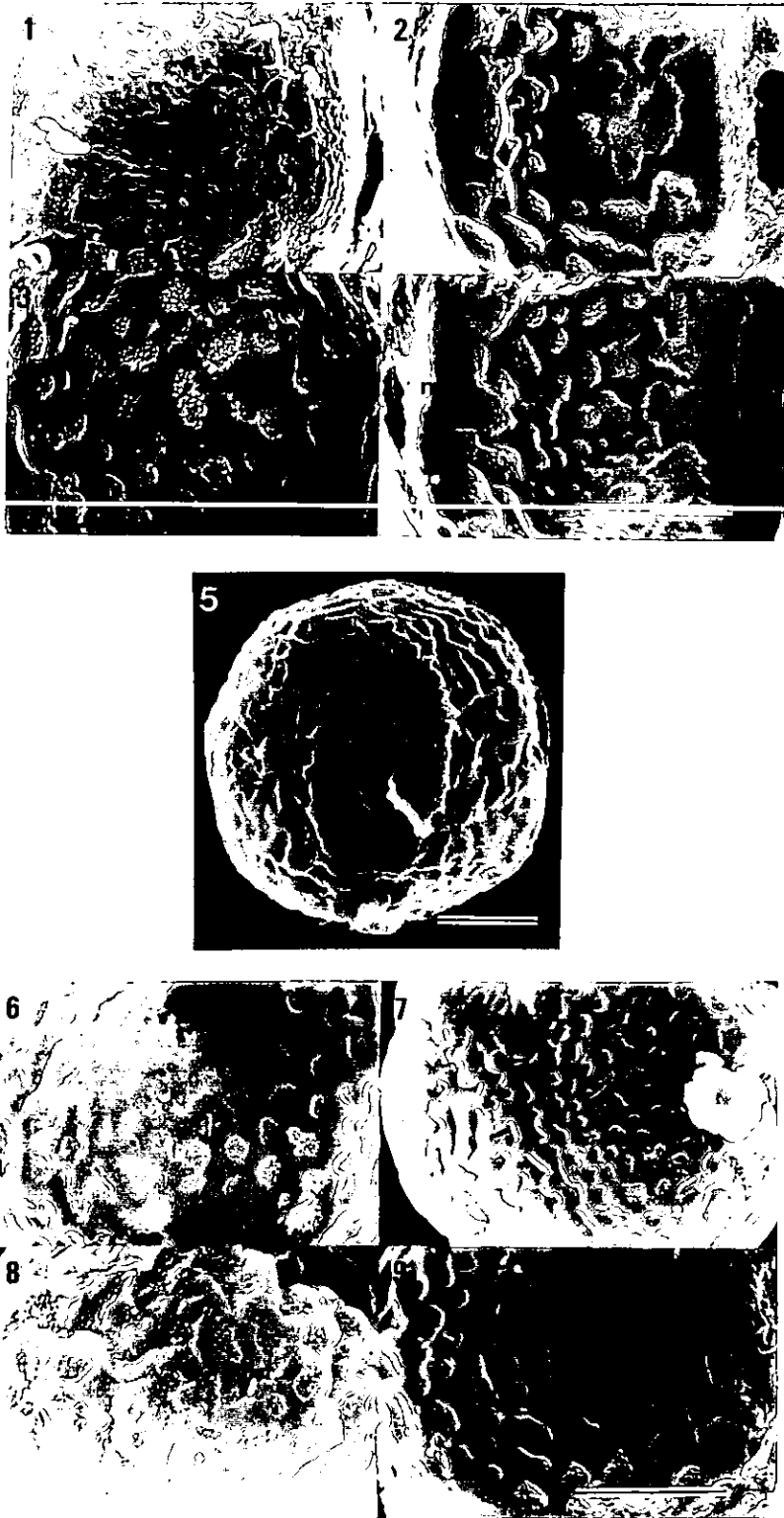
**Lámina 3** *Phaseolus pauciflorus* (población Jalisco). Fig. 1-4 Variación de la estructura en el mesocolpιο . Fig. 5 Vista ecuatorial. Fig. 6-9 Variación de la estructura en el apocolpιο. **g**= gránulos del lumen, **mm**= ápice del margen prolongado formando una valla larga sobre el apocolpιο, **ll**mediaciones del limes, **zi**= zonas intectadas, **v**= verrugas. Barra= 10µm



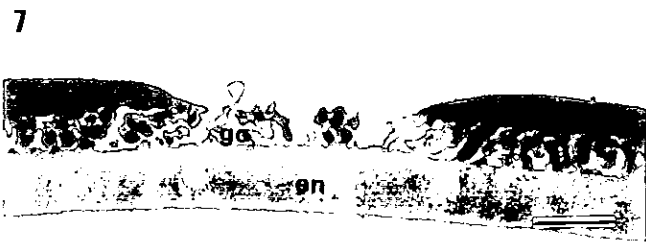
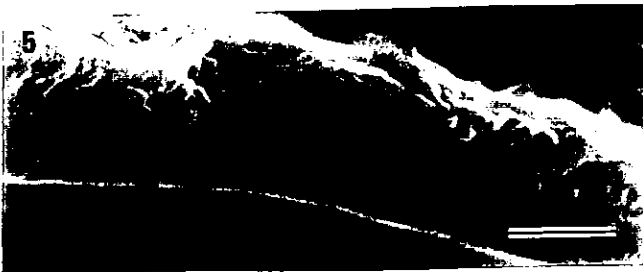
**Lámina 4** *Phaseolus pauciflorus* (población Estado de México). Fig. 1-4 Variación de la estructura del mesocolpio. Fig. 5 vista ecuatorial. Fig. 6-9 variación de la estructura en el mesocolpio. g= gránulos del lumen, mm= ápice del margo prolongado formando una valla larga sobre el apocolpio, l Inmediaciones del limes, zi= zonas intactadas. Barra= 10  $\mu$ m



**Lámina 5** *Phaseolus pluriflorus* Fig. 1-4 Variación de la estructura en el mesocolpio, Fig. 5 Vista ecuatorial. Fig.6-9 Variación de la estructura en el apocolpio. m=margó definido por un cambio en la estructura, zl= zona del limes. Barra= 10  $\mu$ m



**Lámina 6** *Phaseolus zimapanensis* Fig. 1-4 Variación de la estructura en el mesocolpio. Fig. 5 Vista ecuatorial. Fig. 6-9 Variación de la estructura en el apocolpio. **m**= margo psilado con algunas estrias a todo su largo, **mu**= muros, **l**= inmediaciones del limes. **Barra**= 10  $\mu$ m



**Lámina 7** Cortes de exina *Phaseolus leptostachyus* Fig.1-2, *Phaseolus pauciflorus* Fig. 3-4, *Phaseolus pluriflorus* Fig. 5-6, *Phaseolus zimapanensis* Fig. 7-8. t= tectum, est= estructura, en= endexina, co=columelas, go= granulos orientados. Barra= 1  $\mu$ m

## BIBLIOGRAFIA

- Arroyo, M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: R. M. Polhill & P. H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics. Part II* :723-769. Kew. Royal Botanic Gardens, London.
- Bertrand, L. M. 1961. De l'intérêt de la LO-analyse pour l'étude des sculptures de l'ectexine des grains de pollen. 86° Congrès des Sociétés Savantes. pp. 665-611.
- Blackmore, S. & H. G. Dickinson. 1981. A simple technique for sectioning pollen grains. *Pollen et Spores* 3 (2): 281-285.
- Bronckers, F. 1968. Les nomenclatures en palynologie. *Bulletin de la Société de Botanique Belgique* 101: 23-34.
- Brooks, J. & G. Shaw. 1978. Sporopollenin: a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry. *Grana* 17: 91-97.
- Cerceau, M.T., M. Hideux, L. Marceu & F. Roland. 1970. Cassure du pollen par les ultrasons pour l'étude structurale de l'exine au microscope électronique a balayage. *C. R. Acad. SWci. Paris*. pp. 66-69.
- Delgado-Salinas, A. 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* (Leguminosae), in Mexico and Central America. Ph. D. dissertation, University of Texas, Austin.
- Delgado-Salinas, A., E. Martínez-Hernández & P. Fernández-Ortuño. 1982. Estudio del polen *Phaseolus chiapasanus* Piper, (Leguminosae: Phaseolinae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 43: 25-34.
- Delgado-Salinas, A., A. Bruneau & J.J. Doyle. 1993. Chloroplast DNA phylogenetic studies in New World Phaseolinae (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). *Systematic Botany* 18 (1): 6-17.
- Debouck, D.G. 1988. *Phaseolus* germplasm exploration. In: Ph. Gepts (ed.). *Genetics Resources of Phaseolus Beans*. pp. 3-29.

Erdtman, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. Almquist and Wiksell. Stockholm.

Faegri, K. & J. Iversen. 1964. Text-book of modern pollen analysis. Munksgaard. Copenhagen.

Ferguson, K. I. 1984. Pollen morphology and biosystematics of the subfamily Papilionoideae (Leguminosae). In: W. F. Grant (ed.), Plant Biosystematics. Academic Press, Canada. pp. 377-394.

Ferguson, K.I. 1987. A preliminary survey of the pollen exine stratification in the Caesalpiinoideae. In: C. H. Stirton (ed). Advances in Legume Systematics. Part. 335-385. Kew, Royal Botanic Gardens. London.

Ferguson, K.I. 1981. The pollen morphology of the subfamily Papilionoideae (Leguminosae). In: R. M. Polhill & P. H. Raven (eds.) Advances in Legumes Systematics. Part. : 859-885. Kew, Royal Botanic Gardens. London.

Ferguson, K.I. 1982. Pollen morphology in relation to pollinators in Papilionoideae (Leguminosae). Bot. Journal of the Linnean Society 84: 183-193.

Ferguson, K.I. 1983. The granular interstitium in the pollen of subfamily Papilionoideae Bot. Gard. 29: 77-103.

Guinet, Ph. 1981. Comparative account of pollen characters in Leguminosae. In: R. M. Polhill & P. H. Raven (eds.). Advances in Legume Systematics. Part.II: 789-799. Kew, Royal Botanic Gardens. London.

Guinet, Ph. & I.K. Ferguson. 1989. Structure, evolution, and biology of pollen in Leguminosae. In: C.H. Stirton & J.L. Zarucchi (eds.). Advances in Legume Biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 29: 77-103.

Hemsley, R. A., J. P. Barrie, G. W. Chaloner & C. A. Scott. 1993. The composition of sporopollenin and its use in living and fossil plant systematics. Grana (Suppl.) 1: 2-11.

Heslop-Harrison, J. 1979. Pollen walls as an adaptative system. Ann. Missouri Bot. Gard. 66: 813-829.



- Hesse, M. 1981. The fine structure of the exine in relation to the stickiness of Angiosperm pollen. *Review of Paleobotany and Palynology* 35: 81-92.
- Hideux, M. & L. Marceau. 1972. Techniques d'étude du pollen au MEB: méthode simple de coupes. *Adansonia (Ser 2)* 12 (4): 609-618.
- Horvat, F. & F. Stainier. 1980. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans des genres apparentés. IV. *Pollen et Spores* 22 (2): 139-172.
- Iversen, J. & J. Troels-Smith. 1965. In: Kremp, G. O. W. (edt.). *Morphologic encyclopedia of palynology*. The University of Arizona Press, Tucson. pp. 127.
- Lackey, J. A. 1981. Phaseoleae. In: R. M. Polhill & H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Part.I: 301-327. Kew, Royal Botanic Gardens. London.
- Larson, A. D. & C. D. Lewis. 1961. Fine structure of *Parkinsonia aculeata* pollen I. The pollen wall. *Amer. J. Bot.* 48(10): 934-943.
- Martin, S. P. 1969. Pollen analysis and the scanning electron microscope. *Proceedings of the Second Annual Scanning Electron Microscope Symposium*. pp. 89-103.
- Maréchal, J., J.M. Mascherpa, & F. Stainier. 1978. Etude taxonomique d'une groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de donnée morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28: 1-273.
- Maréchal, J., J. M. Mascherpa & F. Stainier. 1981. Taxonomic study of the *Phaseolus-Vigna* complex and related genera. In: R. M. Polhill & H. Raven (eds.). Part. : 329-335. *Advances in Legume Systematics*. Kew, Royal Botanic Gardens. London.
- Muller, J. 1979. Form and function in angiosperm pollen. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66: 593-632.
- Niezgoda, J. C. , S. M. Feuer & L. I. Nevling. 1983. Pollen ultrastructure of the tribe Ingeae (Mimosoideae: Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 70 (5): 650-667.
- Nowicke, W. J. & J. J. Skvarla, 1979. Pollen morphology: The potential influence in higher order Systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66: 633-699.

- Polhill, R. M. 1994. Classification of the Leguminosae. In: F. A. Bisby, J. Buckingham, J.B. Harbone (eds.). Dictionary of the Leguminosae. Vol. I. Chapman & Hall. London. pp. xxxvi-xliii.
- Polhill, R. M., P. H. Raven, & C. H. Stirton. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: R. M. Polhill & H. Raven (eds.). Part. : 1-13. Advances in Legume Systematics. Kew, Royal Botanic Gardens. London
- Punt, W., S. Blackmore, S. Nilsson & A. Le Thomas. 1994. Glossary of pollen and spore terminology. L.P.P. Foundation, Utrecht. p.p. 71.
- Rowley, R. J. 1981. Pollen wall characters with emphasis upon applicability. *Nord. J. Bot.* 1. 357-380.
- Rowley, R. J., A. O. Dahl & S. Sengupta. 1981. A model exine substructure based on dissection of pollen and spore exines. *Palynology* 5: 107-152.
- Saxena, R. M. 1993. *Palynology*. Oxford & IBH Publishing. New Delhi. p. 128.
- Stainier, F. 1974. Contributions à l'étude palinologique des Papilionaceae, Phaseolae, Phaseolinae. Étude de quelques espèces des genres *Phaseolus* L. *Vigna* Savi et *Physostigma* Balf. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 44: 1-15.
- Stainier, F. & F., Horvat. 1978. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans des genres apparentés. I. *Pollen et Spores* 20 (2): 195-214.
- Stainier, F. & F., Horvat. 1979. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans des genres apparentés. III. *Pollen et Spores* 20 (1-2): 2-30.
- Stainier, F. & F., Horvat. 1983. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans des genres apparentés. V. Le sous-genre *Sigmoidotropis* (Piper) Verdcourt et *Ramirezella strobilophora* (Robinson) Rose. *Pollen et Spores* 25 (1): 5-40.
- Sorensen, M. 1989. Pollen morphology of species and interspecific hybrids in *Pachyrhizus* Rich. ex DC. (Fabaceae: Phaseoleae). 61: 319-339.

- Twari, S. C. *et al.* 1990. In dry pear (*Pyrus comunis* L.) pollen, membranes assume a tightly packed multilamellate aspect that disappears rapidly upon hidration. *Protoplasma* 153: 157-168.
- Van Campo, M. 1976. Patterns of pollen morphological variation within taxa. In: I.K. Ferguson & J. Muller (eds.). *The evolutionary significance of the exine*. Academic Press, London. pp. 125-137.
- Van Campo, M. & B. Lugardon. 1973. Structure grenue infratectale de l'ectexine des pollens de quelques Gymnospermes et Angiospermes. *Pollen et Spores* 15 (2): 171-187.
- Van Campo, M. & J. Sivak. 1972. Structure alvéolaire de l'ectexine des pollens à ballonnets des Abietacées. *Pollen et Spores* 14 (2): 115-141.
- Walker, J. W. 1974. Evolution of exine structure in the pollen of primitive Angiosperms. *Amer. J. Bot.* 61(8): 891-902.
- Walker, J. W. 1976. Evolutionary significance of the exine in the pollen of primitive Angiosperms. In: I.K. Ferguson & J. Muller (eds.) *The evolutionary significance of the exine*. Academic Press, London. p.p. 251-308.
- Walker, J. W. & J. A. Doyle. 1975. Palynology. *Ann. Mo. Bot. Garden* 62(3): 664-723.
- Wodehouse, R. P. 1935. *Pollen grains. Their structure, identifications and significance in science and medicine*. New York & London. p.p. 574.