

ANÁLISIS COMPARATIVO DE SEMILLAS EN LAS ESPECIES DEL
GÉNERO *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE; CAESALPINIOIDEAE,
DE TARIEAE) EN VENEZUELA.

*Lila de Parisca, Nereida Xena de Enrech
y Mary T. Kalin Arroyo¹.*

Universidad Central de Venezuela.

Facultad de Ciencias. Escuela de Biología.

Apartado 5892, Caracas.

¹ Dirección actual: Departamento de Biología.

Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Casilla 653, Santiago. Chile

Se estudian comparativamente semillas pertenecientes a las tres especies del género *Copaifera* L. de Venezuela. Se comparan las semillas en cuanto a tamaño, intensidad de pigmentación, estriación de la superficie, conformación externa de la cutícula, morfología externa de la semilla y del embrión, anatomía del embrión y la cubierta seminal y comportamiento de germinación. Las características de las semillas fortalecen las relaciones establecidas en base a otras características y apoyan el tratamiento sistemático, sugerido por Xena et al (en preparación).

CONTENIDO

INTRODUCCION (216)

MATERIALES Y METODOS (216)

RESULTADOS (217)

Morfología general de la semilla y el embrión (217).

Anatomía de la cubierta seminal (217).

Anatomía del embrión (219).

Discusión (220).

Reconocimientos (222).

Bibliografía (222).

Figuras (223).

INTRODUCCION

Este trabajo es parte de un estudio sistemático del género *Copaifera* L. representado en Venezuela por tres especies: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera pubiflora* Benth. y *Copaifera venezuelana* var. *laxa* Xena & Arroyo. Comprenden árboles de hasta 30 m de altura, que crecen en Venezuela en gran parte de su territorio ocupando hábitats de tierra caliente, entre 0 y 300 m, de altitud tanto en ecosistemas de sabana, como de bosques deciduos secos y semisecos, bosques de galería y bosques húmedos tropicales. El hecho de que aparentemente existe gran uniformidad entre las semillas de una localidad determinada, pero hay diferencias visibles entre las distintas localidades donde fueron coleccionadas las semillas, motivó la realización de este trabajo, como complemento a otros estudios comparativos en relación con este género (Xena, Arroyo & Langenheim en preparación; Xena & Arroyo, en preparación). La utilización de las características de la semilla con fines comparativos en trabajos ecológicos, taxonómicos o biosistemáticos tiene ya un amplio record (Watson, 1948; Scott et al, 1962; Werker et al, 1973; Newell & Hymowitz, 1978) y la relación entre las características de la cubierta seminal y el comportamiento durante la imbibición también ha sido señalado (Watson, 1948; Corner, 1951; Werker et al, 1973). En este trabajo describimos morfológica y anatómicamente las semillas de las tres especies de *Copaifera* en Venezuela. También se comparan varias características de las semillas con características ambientales.

MATERIALES Y METODOS

Las semillas maduras fueron coleccionadas directamente del suelo, al pie de la planta, y mantenidas secas hasta su estudio (sin tratamiento especial). Antes de realizar los cortes a mano, fueron ablandadas en agua durante un tiempo mínimo de 8 días, después del cual y para evitar su deterioro fueron mantenidos en alcohol 70%. Cortes transversales y longitudinales (15 micras aproximadamente de espesor) fueron coloreados con los reactivos Sudán III, floroglucinol, cloruro férrico, azul de toluidina, Iodo en Ioduro de potasio, para su estudio en microscopio óptico. Para su estudio anatómico los cortes fueron aclarados en cloro comercial al 10%.

Pequeños pedazos de cubierta seminal fueron preparados con una capa de oro en bajo vacío, para su estudio al microscopio de barrido. Para los estudios de comportamiento se utilizaron: para determinación de porcentajes de germinación 50 semillas de cada localidad sembradas en condiciones uniformes y para imbibición se tomó el tiempo mínimo de ruptura de la cubierta seminal.

RESULTADOS

Morfología General de la Semilla y del Embrión.

Las variaciones encontradas en cuanto a peso, intensidad del color y comportamiento de imbibición y germinación se presentan en la Tabla I. Se señala también allí la precipitación total, durante los meses de desarrollo del fruto, para cada una de las localidades estudiadas; esta información se relaciona con los pesos promedios de las semillas en la Figura 1.

La semilla del género *Copaifera* está casi totalmente cubierta por un arilo de color blanco mientras está pegada a la planta. Al desprenderse la semilla, el arilo adquiere un color rojizo; el arilo es de origen funicular, constituido por células parenquimáticas grandes y cuyo contenido es básicamente azúcares no reductores (Leal & Szwarcbort, comunicación personal).

La forma de la semilla es oblonga, con hilo subapical y micrópilo ligeramente abultado, presenta una depresión lineal muy ligera que comienza en el extremo hilar y bordea toda la semilla (Figura 2 a, b). Superficialmente sobre la cubierta seminal puede observarse a simple vista unas estrías, que en algunas especies son largas y en otras cortas, y que se orientan paralelamente hacia la depresión lineal, siendo más notorias en una especie que en las otras.

El embrión es recto, ocupando toda la cavidad de la semilla, con cotiledones gruesos, simétricos, muy compactos, blancos y de bordes enteros, radícula totalmente cubierta por los cotiledones, plúmula muy poco desarrollada. No se observó endosperma (Figura 2a).

Anatomía de la cubierta seminal en las distintas especies.

C. officinalis. (Figura 3).

Cubierta seminal de 346 micras promedio de espesor, cuyos tejidos son: a. Cutícula superior que se desprende fácilmente; ondulada, presentándose más gruesa sobre las paredes anticlinales; en vista superficial se ve interrumpida por grietas, observándose impresiones hexagonales cada una con un poro central (Figura 3c). El microscopio de barrido muestra una superficie rugosa, donde se observan los poros de diferentes formas y tamaños y no se notan las impresiones hexagonales (Figura 3d). b. Epidermis superior con capa de malpighi de 89 micras de espesor, con células alargadas radialmente, divididas casi exactamente por la mitad mediante un aparente estrangulamiento de sus paredes, que forma una hilera de espacios romboideos (Figura 3e), la cual se observó en las tres especies; lumen celular ancho en la base y haciéndose lineal a una misma altura. c. Hipodermis con células típicamente en forma de vidrio de reloj, de 61

micras promedio de espesor, con paredes casi regularmente engrosadas, abundantes puntuaciones laterales, espacio intercelular variable, (Figura 3f-g) el tamaño de estas células en relación a la epidermis es de 0,69 y respecto al mesófilo 0,31. d. Mesófilo de 198 micras promedio de espesor, constituido por dos tipos de células, un primer tipo de 10 capas aproximadamente de las cuales las superiores son grandes, ligeramente alargadas tangencialmente, sin espacios intercelulares y con paredes regularmente engrosadas, y hacia la epidermis inferior células mucho más obliteradas tangencialmente; el segundo tipo está constituido por células de número, forma, tamaño y engrosamiento muy variados, con espacios intercelulares grandes, observándose ocasionalmente células con denso contenido (Figura 3h). El mesófilo se presenta mucho más amplio en los cantos de la semilla, donde además presenta un haz vascular (Figura 3i). e. epidermis inferior de 4 micras de espesor aproximadamente, completamente cutinizada.

C. publiflora. (Figura 4)

Cubierta seminal de 437 micras promedio de espesor, cuyos tejidos son: a. Cutícula superior que se desprende de la epidermis al hacer las secciones transversales, ondulada, más gruesa sobre las paredes anticlinales de las células epidérmicas, en vista superficial (Figura 4c), pueden notarse impresiones hexagonales de variados tamaños con un poro en la parte central, además se observan las grietas de formas irregulares y tamaño variado. El microscopio de barrido muestra una superficie lisa, con ondulaciones muy marcadas de formas irregulares. (Figura 4d). b. Epidermis superior, con capa de malpighi de 86 micras de espesor, divididas por el estrangulamiento propio del género, lumen celular lineal, amplio hacia la base de dichas células. (Figura 4e). c. Hipodermis, con células típicamente en forma de vidrio de reloj de 59 micras de espesor, de paredes tangenciales delgadas y radiales muy engrosadas, este engrosamiento en la mayoría de los casos se hace a expensas del lumen celular, por lo que los espacios intercelulares son variables, no se observaron puntuaciones laterales en estas células (Figura 4f); el tamaño de estas células en relación a la epidermis es de 0,69 y respecto al mesófilo 0,21. d. Mesófilo de 281 micras promedio de espesor, constituida por tres tipos de células, el primer tipo y a continuación de la hipodermis es de más o menos dos capas de células en forma de vidrio de reloj deformadas; el segundo tipo de alrededor de siete capas, de las cuales las tres superiores son células grandes, más o menos alargadas tangencialmente con sus paredes regularmente engrosadas, en algunos casos dispuestas en hileras radiales y con poco espacio intercelular, y las cuatro capas restantes se presentan mucho más obliteradas y sin espacios intercelulares; el tercer tipo, constituido por células de número, tamaño,

forma y engrosamientos muy variables, algunas de las cuales presentan contenido granuloso denso al microscopio óptico, (Figura 4g), con abundantes espacios intercelulares. El mesófilo se presenta mucho más amplio en los cantos de la semilla, donde presenta el haz vascular. (Figura 4h). e. **Epidermis inferior** de 11 micras aproximadamente de espesor completamente cutinizada.

C. venezolana var laxa. (Figura 5).

Cubierta seminal de 461 micras promedio de espesor, cuyos tejidos son: a. **cutícula superior** que se desprende de la epidermis al hacer las secciones transversales, e igual que en el caso anterior es ondulada y más gruesa sobre las paredes anticlinales de las células epidermicas, notándose también las impresiones hexagonales con poro central en vista superficial al microscopio óptico. (Figura 5c). El microscopio de barrido muestra también en forma semejante al caso anterior una superficie más o menos lisa, pero siendo aquí los poros de forma lineal. (Figura 5d). b. **Epidermis superior**, con capa de malpighi de 94 micras de espesor, donde también se observa el estrangulamiento central, lumen celular lineal, haciéndose amplio hacia la base de las células. (Figura 5e). c. **Hipodermis**, con células típicamente de vidrio de reloj de 53 micras de espesor, de paredes tangenciales delgadas y radiales muy engrosadas, con espacios intercelulares de tamaño variable, no observándose puntuaciones laterales (Figura 5f); el tamaño de estas células en relación a la epidermis es de 0.56 y respecto al mesófilo 0,17. d. **Mesófilo** de 310 micras promedio de espesor, constituido por tres tipos de células, el primer tipo a continuación de la hipodermis es de una o dos capas de células en forma de vidrio de reloj distorsionadas (Figura 5g); el segundo tipo de alrededor de 16 capas de células, de las cuales las hileras superiores poseen células grandes, más o menos alargadas tangencialmente, de paredes uniformemente gruesas, con poco espacio intercelular; las capas restantes obliteradas tangencialmente y sin espacios intercelulares; el tercer tipo, adyacente a la epidermis inferior, constituido por células de número, forma, tamaño y engrosamiento variables, algunas con contenido denso al microscopio óptico, con espacios intercelulares irregulares (Figura 5h). El mesófilo, como en los casos anteriores, se presenta mucho más amplio en los cantos de la semilla, donde se encuentra el haz vascular. e. **Epidermis inferior** de aproximadamente 4 micras de espesor completamente cutinizada.

Anatomía del Embrión.

Todas las especies de este género en el país, presentan el mismo patrón de tejidos en sus cotiledones; una epidermis que protege a una masa de

células parenquimáticas que tienen espesos engrosamientos angulares (Figura 2c-d); haces vasculares incipientes forman una línea alrededor de los cotiledones.

DISCUSION

La morfología de la semilla y el embrión son muy semejantes para las tres especies de *Copaifera* de Venezuela.

La anatomía de la cubierta seminal de las especies estudiadas presenta en líneas generales el esquema señalado por Corner (1951) como típico para las Leguminosas. Sin embargo tenemos detalles que parecen propios del género *Copaifera*, así como diferencias a nivel de especies que mencionaremos a continuación:

La cutícula que cubre la epidermis superior aparece al microscopio óptico igual para las tres especies, es decir, con ondulaciones sobre la pared anticlinal, pero, al microscopio de barrido se presentan en cada caso con diferentes amplitudes en los poros centrales de las impresiones hexagonales, y en *C. officinalis* mucho más rugosa. La epidermis superior también es igual en los tres casos, presentando el ya mencionado aparente estrangulamiento en la pared radial, lo cual forma una hilera de espacios a un mismo nivel, y que divide las células epidérmicas en dos mitades casi iguales (Figura 2e). La hipodermis típicamente en forma de vidrio de reloj, es en *C. officinalis*, de mayor tamaño (Figura 3f y g) que en las otras dos especies, con paredes igualmente engrosadas y abundantes puntuaciones laterales, en cambio en *C. pubiflora* y *C. venezolana* es de menor espesor (Figuras 4b y 5f), y sus células comparativamente tienen paredes tangenciales más delgadas y radiales fuertemente engrosadas. Las puntuaciones se observan en estas dos últimas especies sólo ocasionalmente. Las relaciones de tamaño entre la hipodermis y el espesor total del mesófilo es notable, siendo de 0,31 para *C. officinalis*, contra 0,21 y 0,17 para *C. pubiflora* y *C. venezolana* respectivamente. Esto se debe a dos razones, una de ellas a que en *C. officinalis* el mesófilo es comparativamente más delgado y otra que las células de la hipodermis son más alargadas.

El mesófilo de *C. officinalis* sólo ocasionalmente presenta la hilera de células de vidrio de reloj distorsionadas a continuación de la hipodermis, mientras que en las dos especies restantes siempre está presente en las preparaciones observadas. También parece ser más escaso en *C. officinalis* el contenido denso al microscopio óptico observado en la capa inferior del mesófilo, el cual es abundante en *C. pubiflora* y *C. venezolana*.

Por último el espesor promedio total de la cubierta seminal es mucho menor en *C. officinalis* que en las otras especies.

Los valores de peso de la semilla se encontraron significativamente

relacionados con la precipitación total caída durante los meses de maduración de los frutos y desprendimiento de las semillas en las localidades donde éstas fueron colectadas. Así tenemos que *C. pubiflora* que presenta en general los menores valores de peso, es la que habita en lugares en que el clima estacional de temporada de lluvias y temporada seca es más estricto, de seis meses de duración en cada caso y con la particularidad de que los frutos se desarrollan y las semillas se desprenden en plena época de sequía. el caso especial de la población de Caicara, con un alto valor promedio de peso, quizás puede explicarse por el hecho de que las semillas fueron recolectadas en una zona de estero inundable. Por otra parte *C. officinalis* que exhibe los mayores valores promedio en peso, es de hábitats donde la precipitación en los meses de maduración de los frutos es abundante.

La relación entre hábitats secos e intensidad y brillo del color de las semillas, ya ha sido observado por otros autores (Werker et al, 1973) e implica una mayor pigmentación en las células de la cubierta y un espesor mayor en la cutícula superior, lo cual en nuestro caso, se observa claramente en el microscopio de barrido.

Respecto al comportamiento de las semillas en imbibición y germinación también se detectaron diferencias, destacándose aquí los resultados de *C. officinalis* de ambiente más húmedo en la época de desprendimiento de las semillas, en las cuales el tiempo mínimo necesario para lograr la ruptura de la cubierta seminal en imbibición es menor que en las otras dos especies. Podemos relacionar este hecho con la humedad mucho más constante de su hábitat donde no se corre el peligro de que ésta sea pasajera e insuficiente para que transcurra con éxito el proceso de germinación. En cuanto a la tendencia a un mayor porcentaje de germinación en *C. officinalis* (esta diferencia no resultó estadísticamente significativa entre las tres especies), no podemos asegurar que ésto sea una característica general de la especie, quizás se deba sólo a una respuesta casual de las semillas utilizadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idea propuesta por Xena et al (en preparación) de que *C. pubiflora* y *C. venezuelana* están más relacionadas entre sí que cualquiera de ellas con *C. officinalis*.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada para el desarrollo de este trabajo a las siguientes personas e instituciones:

- CONICIT. Proyecto N° 3. 126 SI.
 CONICIT. Financiamiento de Trabajo Especial de Grado de Nereida Xena de Enrech. UCV. Biología. Botánica.
 Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. U.C.V. Proyecto Dra. Mary Kalin Arroyo.
 Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias. UCV, y especialmente al Dr. Ogura.
 Laboratorio de Fotografía de la Facultad de Ciencias, UCV, y especialmente al Prof. Herrera.
 Haydee Fariñas, Técnica de la Escuela de Biología, UCV.
 Sixto García, dibujante de la Escuela de Biología, UCV.

BIBLIOGRAFIA

- CORNER, E. J. H. 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1: 117-150.
 1976. The seeds of Dicotyledons. Vol. I y II. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
 NEWELL, C. A. y T. HYMOWITZ. 1978. Seed coat variation in *Glycine* Willd. subgenus *Glycine* (Leguminosae) by SEM. *Brittonia* 30: 76-88.
 SCOTT, F. M., B. G. BYSTROM, y E. BOWLER. 1962. *Cercidium floridum* seed coat, light and electron microscope study. *Am. J. Bot.* 49: 821-833.
 WATSON, D. P. 1948. Structure of the testa and its relation to germination in the Papilionaceae tribes Trifoliae and Loteae. *Ann. Bot. (N.S.)* 12: 385-409.
 WERKER, ELLA, A. DAFNI y M. NEGBI. 1973. Variability in *Prosopis farcata* in Israel: anatomical features of the seed. *Bot. J. Linn. Soc.* 66: 223-232.
 XENA DE E., NEREIDA, Mary T. KALIN ARROYO y Jean LANGENHEIM. Sistemática del género *Copaifera* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae) en Venezuela. (En preparación).
 XENA DE E. NEREIDA y MARY T. KALIN ARROYO. Análisis de Taxonomía Numérica, aplicado a la revisión del género *Copaifera* L. en Venezuela. (En preparación).

TABLA I
Comparación por localidades de caracteres morfológicos
y de comportamiento de las semillas.

Especie	Localidad	PP ¹ (mm)	Peso (gr) Promedio	Color	T(h)	%G
△	Machiques (Zulia)	135	0,65	mate	120	49,7
△	Pta. Gorda (Zulia)	115	0,75	mate	120	38,6
●	Río Arauca (Apure)	16	0,56	brillante	120	41,9
●	Tinaco (Cojedes)	95	0,60	brillante	120	63,0
●	Calabozo (Guárico)	21	0,52	brillante	120	54,9
●	Las Mercedes (Guárico)	25	0,58	brillante	120	51,1
●	Caicara (Bolívar)	23	0,85	brillante	120	56,0
○	Guri (Bolívar)	400	0,75	mate	60	77,8
○	Cdad. Piar (Bolívar)	278	0,65	mate	60	84,0
○	Maturín (Monagas)	440	0,87	mate	60	86,4
○	Mochima (Sucre)	118	0,72	mate	60	77,2

△ = *C. venezuelana* var. *laxa*;

● = *C. pubiflora*;

○ = *C. officinalis*

1. = precipitación total en los meses de maduración del fruto, estimada como promedio de varios años.