

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS
NATURALES**

**ESTUDIOS EMBRIOLÓGICOS Y DE
DESARROLLO DE FLORES E INFLORESCENCIAS
EN BARNADESIOIDEAE (ASTERACEAE)**

Por

Lic. Rocio Cecilia Iribarren

Directores: Dr. Raúl E. Pozner & Dra. Estrella Urtubey

Instituto de Botánica Darwinion



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

2023

*A mis maestros
Y a la Universidad Pública*

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las dos personas que hicieron este trabajo de tesis posible: mis directores Estrella y Raúl. Gracias por estar siempre disponibles ante cualquier consulta, trabajando hombro a hombro conmigo, aconsejándome, conteniéndome durante todo el trayecto de estos cinco años en que al final se mezcló lo personal con lo profesional porque termino esta experiencia recordando ante todo las excelentes personas que son. Gracias por compartir sus ideas y proyectos.

A todos los compañeros y compañeras del Instituto de Botánica Darwinion con especial mención a tres personas: Juca San Martín, el alquimista, sin vos no podría haber hecho gran parte de la tesis, me guiaste en el laboratorio, aprendí técnicas y siempre me gustó escucharte., a Juan Manuel Acosta, gracias totales por la ayuda, el compañerismo, los favores, los mates, la música y finalmente a Marcelo Moreno, el del alma artista pero con la objetividad científica, gracias por tu amistad y toda tu asistencia, que fué tanta que ya perdí la cuenta.

Ahora si a corazón abierto: a mi familia y amigos...soy por ustedes. A mi hija y mi esposo, mis amores, gracias por mostrarme el futuro y caminar conmigo hacia él., a mi Mami y a Darío, gracias por bancar la parada (mami en la canción de Charly "Alguien en el mundo piensa en mí" sé que esa sos vos)., a Papi, Mirta y la Abuela, gracias por estar siempre, por ser como un suelo firme bajo mis pies que no se hunde, no se embarra, no se inclina. A mi nueva familia, los Bauer-Iribarren, que le pusieron un plato de comida caliente a mi corazón los domingos de invierno. A mis primas, lejos o cerca nos vemos mucho o poco pero son mis hermanas. A mi amiga Celeste, 15 años no son nada, a Marian... Marianin (ya sabés) y a Juanchi & Sofí por alegrarme los días en la casa más linda del mundo.

Todos ustedes hicieron de estos años una época que voy a recordar siempre como lo que fué: un capítulo más de este viaje maravilloso que es la vida...pero un capítulo extraordinario.

Y finalmente me agradezco a mi misma porque creí en mi proyecto y no claudiqué, y como manuelita, seguí caminando, despacito y llegué.

Como dice el dicho, ninguna victoria es definitiva, ningún fracaso es final, lo único que cuenta es la voluntad para seguir adelante, y como dice el otro (para ser nac&pop) vos tirá del carro que los melones se acomodan solos.

A seguir tirando.....

Gracias

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
1 INTRODUCCIÓN	9
1.1 La familia Asteraceae	9
1.1.1 Aspectos taxonómicos y filogenia.....	9
1.1.2 Aspectos embriológicos de Asteraceae.....	10
1.1.3 Desarrollo de la inflorescencia y desarrollo floral en Asteraceae.....	13
1.2 La subfamilia Barnadesioideae	13
1.2.1 Filogenias y aspectos taxonómicos	13
1.2.2 Los géneros <i>Archidasphyllum</i> , <i>Arnaldoa</i> , <i>Barnadesia</i> , <i>Chuquiraga</i> , <i>Dasyphyllum</i> , <i>Doniophyton</i> , <i>Duseniella</i> , <i>Fulcaldea</i> , <i>Huarpea</i> y <i>Schlechtendalia</i> : La Inflorescencia.....	17
1.2.3 Aspectos embriológicos.....	20
1.2.4 Desarrollo de inflorescencias y flores.....	21
1.2.5 Aspectos morfológicos, anatómicos y microcaracteres.....	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 Fundamentos	24
2.2 Objetivo general	26
2.3 Objetivos específicos	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Preparación de muestras para la observación con microscopía de campo claro ..	27
3.1.1 Inclusiones en parafina.....	27
3.1.2 Inclusiones en resina.....	27
3.2 Preparación de muestras para la observación con microscopio electrónico de barrido	28
3.3 Métodos histoquímicos aplicados a anteras y semillas	29
3.4 Consultas a herbarios y viajes de colecta	30
3.5 Definición de conceptos	30
3.5.1 Desarrollo de inflorescencias y flores.....	30
3.5.2 Esporangiógenesis, microesporogénesis y microgametogénesis.....	34

3.6 Taxones estudiados	36
4. RESULTADOS	40
4.1 Desarrollo de inflorescencias y flores	40
4.1.1 Capítulos discoideos y homógamos	40
Género <i>Chuquiraga</i>	40
Género <i>Arnaldoa</i>	46
Género <i>Schlechtendalia</i>	46
4.1.2 Capítulos disciformes y heterógamos	49
Género <i>Duseniella</i>	49
Género <i>Doniophyton</i>	52
4.1.3 Capítulos radiados y homógamos	53
Género <i>Barnadesia</i>	53
Género <i>Huarpea</i>	56
4.2 Esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis	58
4.2.1 Esporangiogénesis	58
4.2.2 Microsporogénesis	59
4.2.3 Microgametogénesis	60
4.2.4 Dehiscencia de las anteras: mecánica y tejidos involucrados	83
4.3 Desarrollo de ovarios, óvulos y semillas	90
4.3.1 Ovarios y óvulos	90
4.3.2 Semillas	103
4.4 Resumen de resultados	112
5. DISCUSIÓN	116
5.1 Desarrollo de inflorescencias y flores	116
5.1.1 El Desarrollo de la Inflorescencia	116
Meristema de la inflorescencia.....	116
Zonación meristemática en <i>Barnadesia odorata</i>	117
Dirección del fraccionamiento del meristema y de la organogénesis para el capítulo: el atraso de las flores del radio.....	117
Patrón filotáctico y disposición caótica de los primordios.....	119
Orientación variable de las flores respecto al eje del capítulo.....	121
La flor terminal y otras consideraciones del capítulo de Barnadesioideae.....	122

5.1.2 Desarrollo de flores	125
Diferenciación de los verticilos florales.....	125
La iniciación del papus y su homología.....	126
Diferenciación de las flores del radio.....	128
Unisexualidad de las flores del radio de <i>Dusenilla</i> y <i>Doniophyton</i>	129
La especialización de la flor terminal en <i>Huarpea andina</i> y su tendencia a la esterilidad	
130	
Crecimiento zonal: el desarrollo de los indumentos.....	131
5.2 Esporangiógenesis, microsporogénesis y microgametogénesis	133
La esporangiógenesis temprana.....	133
La microsporogénesis y formación de la esporodermis.....	138
El Tapete.....	142
Sustancias de reserva: hidratos de carbono.....	145
Sustancias de reserva: lípidos.....	148
Número de células del grano de polen al momento de la dehiscencia.....	149
Mecanismo de dehiscencia de las anteras: el endotecio y el tejido conectivo.....	150
5.3 Desarrollo de ovarios, óvulos y semillas	154
6. CONCLUSIONES	162
6.1 Desarrollo de inflorescencias y flores	162
Meristema de la Inflorescencia.....	162
Flor terminal.....	162
Desarrollo de flores.....	163
Flores del radio.....	163
Sistemas reproductivos: la especialización de las flores del radio y la flor terminal...	164
Papus.....	164
Indumentos.....	164
6.2 Esporangiógenesis, microsporogénesis y microgametogénesis	164
Esporodermis.....	164
Tapete.....	165
Sustancias de reserva.....	165
Endotecio y tejidos involucrados en la dehiscencia.....	166
6.3 Desarrollo de ovarios, óvulos y semillas	166

Ovarios y óvulos.....	166
Semillas.....	167
7. BIBLIOGRAFÍA.....	168

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Cladograma simplificado de la Familia Asteraceae.....	10
2. Especies de Barnadesioideae.....	15
3. Especies de Barnadesioideae.....	16
4. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Chuquiraga avellanadae</i>	42
5. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Chuquiraga erinacea</i>	43
6. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Chuquiraga erinacea</i> y <i>Chuquiraga jussieui</i>	44
7. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Chuquiraga ruscifolia</i>	45
8. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Chuquiraga ulicina</i>	46
9. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Arnaldoa macbrideana</i> y <i>Schlechtendalia luzulifolia</i>	47
10. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Schlechtendalia luzulifolia</i>	48
11. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Duseniella patagonica</i>	50
12. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Duseniella patagonica</i>	51
13. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Doniophyton weddellii</i>	52
14. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Barnadesia odorata</i>	54
15. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Barnadesia odorata</i> y <i>Barnadesia aculeata</i>	55
16. Desarrollo de inflorescencias y flores de <i>Huarpea andina</i>	56
17. Desarrollo de flores y estilos de <i>Huarpea andina</i>	57
18. Esquema simplificado de la esporangiogénesis.....	58
19. Esquema simplificado de la microspora, y grano de polen durante la microsporogénesis y microgametogénesis.....	60
20. Esquema simplificado de los resultados obtenidos a partir de observaciones con microscopia de campo claro de granos de polen bajo distintos métodos histoquímicos.....	62
21. Esquema simplificado de los resultados obtenidos a partir de los ensayos histoquímicos para identificar reservas de los granos de polen.....	63
22. Microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Barnadesia odorata</i>	63
23. Microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Barnadesia odorata</i>	64
24. Microgametogénesis de <i>Barnadesia odorata</i>	65
25. Microgametogénesis de <i>Chuquiraga aurea</i> y microsporogénesis y microgametogénesis	

de <i>C. erinacea</i>	66
26. Microgametogénesis de <i>Chuquiraga jussieui</i>	67
27. Microgametogénesis de <i>Chuquiraga parviflora</i>	68
28. Esporangiogénesis de <i>Chuquiraga avellanadae</i> y esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis de <i>C. ruscifolia</i>	69
29. Esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Dasyphyllum brasiliense</i>	70
30. Microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Dasyphyllum brasiliense</i>	71
31. Microgametogénesis de <i>Doniophyton anomalum</i>	72
32. Microsporogénesis de <i>Doniophyton weddellii</i>	73
33. Microgametogénesis de <i>Doniophyton weddellii</i>	74
34. Esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Duseniella patagonica</i> 75	
35. Microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Duseniella patagonica</i>	76
36. Microgametogénesis de <i>Duseniella patagonica</i>	77
37. Microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Huarpea andina</i>	78
38. Microgametogénesis de <i>Huarpea andina</i>	79
39. Esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Schlechtendalia luzulifolia</i>	80
40. Esporangiogénesis y microsporogénesis de <i>Schlechtendalia luzulifolia</i>	81
41. Microsporogénesis y microgametogénesis de <i>Schlechtendalia luzulifolia</i>	82
42. Esquema simplificado de un corte transversal de las anteras indicando los tejidos que las componen.....	83
43. Esquema simplificado de un corte transversal de las anteras indicando hipodermis conectiva.....	83
44. Cronología de cambios en las capas mecánicas de la antera de <i>Huarpea andina</i>	84
45. Esquema simplificado de células del endotecio con sus engrosamientos.....	85
46. Esquema simplificado del mecanismo de apertura de las anteras.....	86
47. Tejidos mecánicos de la antera de <i>Chuquiraga aurea</i> , <i>C. jussieui</i> , <i>C. parviflora</i> , <i>Doniophyton anomalum</i> y <i>D. weddellii</i>	87
48. Tejidos mecánicos de la antera de <i>Barnadesia odorata</i> y <i>Huarpea andina</i>	88
49. Tejidos mecánicos de la antera de <i>Schlechtendalia luzulifolia</i> y <i>Dasyphyllum brasiliense</i> ..	89

50. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Barnadesia arborea</i>	93
51. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Barnadesia odorata</i>	94
52. Desarrollo de óvulos de <i>Barnadesia odorata</i>	95
53. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Barnadesia odorata</i> y desarrollo de óvulos de <i>Chuquiraga ruscifolia</i>	96
54. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Chuquiraga ruscifolia</i>	97
55. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Doniophyton weddellii</i>	98
56. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Doniophyton weddellii</i>	99
57. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Duseniella patagonica</i>	100
58. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Duseniella patagonica</i>	101
59. Desarrollo de ovarios y óvulos de <i>Huarpea andina</i>	102
60. Anatomía de embrión y pared del fruto de <i>Barnadesia polyacantha</i>	105
61. Anatomía de embrión y pared del fruto de <i>Chuquiraga erinacea</i>	106
62. Sustancias de reserva de embrión de <i>Chuquiraga erinacea</i>	107
63. Anatomía de embrión y pared del fruto de <i>Doniophyton weddellii</i>	108
64. Sustancias de reserva de embrión de <i>Doniophyton weddellii</i>	109
65. Anatomía de embrión y pared del fruto de <i>Duseniella patagonica</i>	110
66. Pared del fruto y sustancias de reserva de <i>Duseniella patagonica</i>	111
67. Esquema simplificado de la progresión de la organogénesis en el capítulo.....	118
68. Esquema simplificado del avance del frente de Iniciación de primordios.....	120
69. Orientación variable de las flores respecto al eje del capítulo en <i>Barnadesia aculeata</i> y <i>B. odorata</i>	121
70. Diagramas florales de Asteraceae y <i>Barnadesia odorata</i>	121
71. Esquema simplificado de tipos de capítulos en Barnadesioideae.....	124
72. Esquema simplificado de la organogénesis en el primordio floral	125
73. Esquema simplificado de la iniciación secuencial del papus.....	127
74. Esquema simplificado de la iniciación al azar del papus.....	127
75. Esquema simplificado de la esporangiogénesis.....	136
76. Mapa conceptual simplificado de la esporangiogénesis. Modelo de Davis (1966) con terminología de Pozner (2001).....	136
77. Mapa conceptual simplificado de la esporangiogénesis. Modelo de Goldberg (1993)..	137
78. Mapa conreptual simplificado de la microsporogénesis y microgametogénesis. Modelo	

de Goldberg (1993).....	139
79. Esquema simplificado de la cronología de desarrollo de las capas de la esporodermis	141
80. Esquema simplificado del desarrollo del óvulo unitegumentado en Asteraceae.....	155
81. Esquema simplificado de los óvulos anátropos unitegumentados de Barnadesioideae	158

ÍNDICE DE TABLAS

1. Resumen de la diversidad de caracteres de los procesos embriológicos de las Asteraceae	11
2. Resumen de Test histoquímicos y su especificidad y respuesta a la tinción en las capas de la esporodermis.....	30
3. Sincronización de eventos del desarrollo entre el óvulo y la megasporogénesis y megagametogénesis.....	92
4. Progresión del fraccionamiento del meristema y de la organogénesis para el capítulo y orden de diferenciación de los verticilos florales.....	112
5. Caracteres embriológicos masculinos para Angiospermas y Asteraceae	133
6. Estadios del desarrollo de anteras en <i>Oryza sativa</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	137
7. Polen maduro en Barnadesioideae según el tipo de reserva de polisacáridos.....	145
8. Características morfológicas y fisiológicas de los sistemas gametofitos y esporofíticos multialélicos.....	150

RESUMEN

La familia Asteraceae es una de las más diversas de las Angiospermas y varios análisis filogenéticos la han ubicado como el grupo hermano de la familia Calyceraceae, en un clado bien soportado, conocido como el clado MGCA (Menyanthaceae, (Goodeniaceae, (Calyceraceae, Asteraceae))) (Lundberg & Bremer, 2003). Hipótesis recientes sugieren la presencia de un ancestro paleotetraploide para el clado Calyceraceae + Asteraceae y uno paleohexaploide para la familia Asteraceae (Barker *et al.*, 2016). Las Barnadesioideae, con sólo 10 géneros y 95 especies, endémicas de América del Sur (Mandel *et al.*, 2019), son el clado hermano de las restantes asteráceas (con entre 25000 y 35000 especies).

A pesar de la enorme diversidad morfológica de las Asteraceae, dos estructuras consideradas innovaciones evolutivas las definen: la inflorescencia (capítulo) y el fruto (cipsela anemócora). Sobre la base de estudios del control genético del desarrollo en *Gerbera* (Asteraceae) y de desarrollo de las inflorescencias de las Calyceraceae, hoy se sabe que la inflorescencia o capítulo, interpretada históricamente como el resultado de la condensación de un racimo, ha tenido su origen en la modificación de una inflorescencia más compleja llamada tirsoide. En este sentido, el conocimiento del desarrollo de los capítulos de las barnadesioideas es particularmente relevante para interpretar la transición evolutiva entre las inflorescencias tirsoides y los capítulos típicos de las Asteraceae. Además de su diversidad morfológica, las asteráceas poseen una gran diversidad de caracteres en sus procesos embriológicos, conocida por las cerca de 350 publicaciones en los últimos 100 años siendo escasos los estudios embriológicos en la subfamilia Barnadesioideae.

En los últimos años, la reconstrucción de filogenias sobre la base de caracteres moleculares ha permitido combinar la morfología y la embriología para interpretar su evolución en los géneros, tribus, familias, órdenes, e inclusive clados de rango mayor. Por ello, para poder comprender la evolución de la diversidad de caracteres reproductivos en general, y de los procesos embriológicos en particular en la familia Asteraceae es fundamental estudiarlos en las barnadesioideas.

El objetivo de esta tesis es brindar una caracterización detallada y representativa del desarrollo de las inflorescencias, las flores, y de los procesos embriológicos de la subfamilia Barnadesioideae, enfocada en los siguientes cuatro aspectos: (1) el desarrollo temprano de las inflorescencias y flores, (2) las causas embriológicas del dimorfismo floral funcional (flores estaminadas/carpeladas vs. perfectas) presente en algunas especies de Barnadesioideae, (3) el desarrollo embriológico de las estructuras reproductivas masculinas

(microesporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis) y (4) el desarrollo de los ovarios, óvulos, la estructura del fruto y la semilla, y el tipo de sustancia de reserva.

Se estudió por primera vez el desarrollo temprano de los capítulos en una muestra amplia de especies de las Barnadesioideae con capítulos radiados en *Barnadesia aculeata*, *B. odorata* y *Huarpea andina*, con capítulos discoideos en *Chuquiraga avellanadae*, *C. erinacea*, *C. jussieui*, *C. ruscifolia*, *C. ulicina*, y *Schlechtendalia luzulifolia*, y con capítulos disciformes en *Doniophyton weddellii* y *Duseniella patagonica*, con observaciones de microscopía electrónica de barrido de inflorescencias diseccionadas en sus etapas más tempranas del desarrollo, complementadas con observaciones de microscopía de campo claro de cortes histológicos.

Los resultados obtenidos mostraron variabilidad en cuanto a la forma del meristema, encontrándose planos y convexos y registrándose por primera vez el fenómeno de zonación meristemática en *Barnadesia odorata*. La mayoría de las especies analizadas exhiben pérdida del patrón filotáctico con zonas de receptáculo libre en el ápice hacia el fin de la iniciación y una disposición caótica de los primordios en el centro de la inflorescencia; y la presencia de flor terminal en dos especies de *Chuquiraga* y orientación variable de las flores en el capítulo. También se encontró una variedad de patrones para el fraccionamiento del meristema y para la organogénesis. La identidad de las flores del radio se estableció tempranamente por su tamaño menor como producto de un fraccionamiento diferencial del meristema, de su forma diferenciada y por el retraso en su desarrollo durante la organogénesis.

El orden de iniciación de los verticilos en las flores es corola, androceo y gineceo (CAG), congruente con lo conocido para Asteraceae, y corroborando que la condición gamopétala de la corola se inicia tempranamente, con los lóbulos corolinos desarrollándose a partir de un anillo meristemático expresado en el estado de embudo. Finalmente, el papus es variable respecto a su aparición, iniciándose secuencialmente en cinco puntos alternipétalos.

Los estudios de desarrollo floral de *Doniophyton weddellii* y *Duseniella patagonica* mostraron que la unisexualidad de las flores marginales femeninas se logra mediante el aborto tardío de los estambres o la supresión total o parcial del verticilo, pudiéndose adjudicar estos procesos a la muerte celular programada adelantada del tapete y al silenciamiento de genes controladores de la identidad de los verticilos florales, respectivamente.

Se estudiaron etapas del desarrollo de anteras, de la microesporogénesis y microgametogénesis de *Barnadesia odorata*, *Chuquiraga aurea*, *C. avellanadae*, *C. ruscifolia*, *C. erinacea*, *C. jussieui*, *C. parviflora*, *Dasyphyllum brasiliense*, *Doniophyton anomalum*, *D. weddellii*, *Duseniella patagonica*, *Huarpea andina* y *Schlechtendalia luzulifolia*

mediante cortes histológicos y tests histoquímicos que revelaron la expresión de diferenciación celular premeiótica (DCP) en arquésporas y la extensión del gradiente de DCP a células del tapete y corroboran un desarrollo de la pared del microesporangio de tipo dicotiledóneo, y la multiplicación de arquésporas para la subfamilia. Se observó también la presencia de ambos tipos de tapete, periplasmoidal y secretor, se corroboró su origen doble, y se describió un síndrome de polarización del tapete secretor. Se describió la secuencia ontogenética de aparición de las capas de la esporodermis, su composición con una primexina y endexina polisacáridicas y proteicas, y se corroboró su estructura con ectexina mono, bi o tricapas y presencia o ausencia de cáveas.

Se estudiaron por primera vez para esta subfamilia las sustancias de reserva de los granos de polen revelándose que existen especies *starchy* como *starchless*, condición probablemente relacionada al vector de polinización.

Se describe por primera vez para Barnadesioideae un sistema complejo de interacción de tejidos durante la dehiscencia de las anteras en que participan además del endotecio, el tejido conectivo, la epidermis y la hipodermis conectiva, y se describe la participación diferencial de los tejidos en este mecanismo donde el endotecio de los lóculos externos presenta engrosamientos y una mecánica diferente a la de los lóculos internos.

Mediante las mismas técnicas de inclusiones y cortes histológicos y test histoquímicos se estudiaron etapas del desarrollo de los ovarios y óvulos de *Barnadesia arborea*, *B. odorata*, *Chuquiraga ruscifolia*, *Doniophyton weddellii*, *Duseniella patagonica* y *Huarpea andina*; la anatomía de la semilla, pericarpo y embrión de *Barnadesia polyacantha*; y las sustancias de reserva de los embriones de *C. erinacea*, *D. weddellii* y *Duseniella patagonica*.

Los óvulos son anátropos, unitegumentados, tenuinucelados incompletos, y poseen endotelio, en congruencia con lo conocido para el clado de las euastéridas (*Core eudicots: Asterid alliance*) y para Calyceraceae. Se corroboró el desarrollo de un único tegumento asimétrico o semi anular masivo de 12 a 25 células de espesor.

La pared del fruto muestra un pericarpo con sólo exocarpo remanente, observándose por debajo hasta 8 capas de células correspondientes al tegumento del óvulo consumido. Se encontraron cristales, canales lisígenos o granos de almidón en estas capas. Se observó un embrión recto, espatulado y exendospermado, con una única capa de endosperma, y reservas en los cotiledones, con proteínas como sustancia de reserva principal y lípidos como sustancia de reserva secundaria.

Como conclusión general, las Barnadesioideae no poseen el desarrollo y la estructura típica del capítulo de las restantes Asteraceae, pues aún conservan algunas características que los relacionan con los cefalodios de su grupo hermano, las Calyceraceae, como la presencia de una flor terminal, la orientación variable de las flores respecto del eje del capítulo, e indicios que sugieren una zonación del meristema de la inflorescencia en una

área periférica y otra central. Los resultados obtenidos, contribuyen a la idea original de Erbar & Leins (2000) y los trabajos siguientes de Pozner *et al.* (2012), Claßen Bockhoff & Bull-Hereñu (2013), Zhao *et al.* (2016) y Elomaa *et al.* (2018) que progresivamente desarrollaron la hipótesis del origen evolutivo del capítulo de las Asteraceae a partir de una inflorescencia tirsoidea condensada (cefalodio), cuyo meristema se comporta como un meristema floral, tanto en estructura como en fraccionamiento, donde los primordios de los grupos cimosos se reutilizan para formar flores y la flor central se suprime.

En cuanto al desarrollo floral, la secuencia de iniciación de ciclos florales que comienza con la corola y ubica al cáliz en diferentes momentos posteriores, ya está presente en algunas Calyceraceae y en Barnadesioideae. La iniciación variable del papus y su aparición en cinco puntos alternipétalos sería evidencia, de acuerdo a nuevos resultados del campo de la genética, de su origen sepaloide y su homología con el cáliz y puede considerarse una alteración del desarrollo relacionada a la profunda modificación del cáliz en las Asteraceae (cfr. Naghiloo & Claßen-Bockhoff, 2017).

En cuanto a la sexualidad de las flores, las flores pistiladas de Barnadesioideae pueden haber surgido por dos mecanismos diferentes: uno que detiene el normal desarrollo de la microsporogénesis y otro que inhibe el desarrollo de los primordios estaminales. En las Calyceraceae, en cambio, no hay especies con flores pistiladas, sólo *Acicarpa* combina flores perfectas con estaminadas por interrupción del proceso de megasporogénesis. Es así como el grupo hermano de las Asteraceae tiene especies con todas sus flores perfectas, y especies andromonoicas. La ginomonoecia y la presencia de flores estériles, propia de las Asteraceae, ya está presente en las Barnadesioideae.

En cuanto a los caracteres embriológicos es posible reconocer que las Barnadesioideae poseen un desarrollo normal de las anteras y del polen, que se asemeja al de la mayoría de las dicotiledóneas. La megasporogénesis y megagametogénesis observada en Barnadesioideae, que conduciría a un tipo de desarrollo *Polygonum*, es la más frecuente en angiospermas. En cuanto a la anatomía de óvulos y semillas, los resultados concuerdan con lo ya conocido para Barnadesioideae y con lo esperable para la familia Asteraceae y el clado de las euastéridas.

La información sugiere que las Barnadesioideae poseen procesos embriológicos regulares y comunes a la mayoría de las angiospermas, y que éstos procesos podrían haber estado presentes en el ancestro común más reciente de las Asteraceae, siendo el punto de partida para la inmensa inmensa diversificación embriológica que se conoce en las restantes Asteraceae.

Palabras clave: capítulo, embriología, desarrollo, flor, inflorescencias, meristemas, primordios, células iniciales subepidérmicas, arquésporas, tapete, antera, microsporogénesis, microgametogénesis, óvulos, embrión, fruto, cipsela.

ABSTRACT

The Asteraceae is one of the most diverse families of the angiosperms and several phylogenetic analyses have placed it as the sister group of the Calyceraceae family, in a well-supported clade, known as the MGCA clade (Menyanthaceae, (Goodeniaceae, (Calyceraceae, Asteraceae))) (Lundberg & Bremer, 2003). Recent hypotheses suggest the presence of a paleotetraploid ancestor for the Calyceraceae + Asteraceae clade and a paleohexaploid ancestor for the Asteraceae family (Barker *et al.*, 2016). The Barnadesioideae, with only 10 genera and 95 species, is endemic to South America (Mandel *et al.*, 2019), being the sister clade of the remaining Asteraceae (with between 25,000 and 35,000 species).

Despite the enormous morphological diversity of the Asteraceae, two structures considered evolutionary innovations define this family: the inflorescence (capitulum) and the fruit (wind-dispersed cypsela). Based on studies of the genetic control of development in *Gerbera* (Asteraceae) and development in the inflorescences of Calyceraceae, it is now known that the inflorescence or capitula, historically interpreted as the result of the condensation of a cluster, has had its origin in the modification of a more complex inflorescence called thyrsoid. In this sense, to know the development of the capitula of the barnadesioid is particularly relevant to understand the evolutionary transition between the thyrsoid inflorescences and the typical capitula of the Asteraceae. In addition to their morphological diversity, Asteraceae have a huge diversity of characters in their embryological processes, known from the nearly 350 publications in the last 100 years, with few embryological studies in the subfamily Barnadesioideae.

In recent years, the reconstruction of phylogenies based on molecular characters has allowed combine morphology and embryology to interpret their evolution within genera, tribes, families, orders, and even higher-ranking clades. Therefore, to understand the evolution of the diversity of reproductive characters in general, and of embryological processes in particular in the Asteraceae family, it is essential to study them in barnadesioid. The objective of this thesis is to provide a detailed and representative characterization of the development of inflorescences, flowers, and embryological processes of the subfamily Barnadesioideae focused on the following four aspects: (1) the early development of inflorescences and flowers, (2) the embryological causes of functional floral dimorphism (staminate/carpelate vs. perfect flowers) present in some species of Barnadesioideae, (3) the embryological development of male reproductive structures (microsporangiogenesis, microsporogenesis and microgametogenesis) and (4) the development of ovaries, ovules, the structure of the fruit and seed, and the type of storage substance.

The early development of capitula was studied for the first time in a large sample of species of the Barnadesioideae: with ray capitula in *Barnadesia aculeata*, *B. odorata* and *Huarpea andina*, with discoid capitula in *Chuquiraga avellanadae*, *C. erinacea*, *C. jussieui*, *C. ruscifolia*, *C. ulicina*, and *Schlechtendalia luzulifolia*, and with disciform capitula in *Doniophyton weddellii* and *Duseniella patagonica*, using scanning electron microscopy observations of inflorescences dissected in their earliest stages of development, complemented by light microscopy observations of histological sections.

The results obtained showed variability in the shape of the meristem, being flat and convex, and the phenomenon of meristematic zonation was recorded for the first time in *Barnadesia odorata*. Most of the species analyzed exhibit loss of the phyllotactic pattern with areas of free receptacle at the apex towards the end of initiation and a chaotic arrangement of the primordia in the center of the inflorescence; the presence of a terminal flower in two species of *Chuquiraga* and variable orientation of the flowers in the capitula. A variety of patterns for meristem fractionation and organogenesis were also found. The identity of the ray flowers was established early due to their smaller size as a product of differential fractionation of the meristem, their differentiated shape and the delay during their organogenesis.

The order of initiation of the whorls in the flowers is corolla, androecium and gynoecium (CAG), being consistent with what is known for Asteraceae, and corroborating that the gamopetalous condition of the corolla begins early, with the corolla lobes developing from a meristematic ring expressed in the funnel state. Finally, the pappus inception is variable, starting sequentially at five alternipetal points.

Studies of floral development of *Doniophyton weddellii* and *Duseniella patagonica* showed that the female condition of marginal flowers is achieved by late abortion of the stamens or the total or partial suppression of the whorl, these processes being able to be attributed to the early programmed cell death of the tapetum and to the silencing of genes controlling the identity of floral whorls, respectively.

Stages of anther development, microsporogenesis and microgametogenesis were studied in *Barnadesia odorata*, *Chuquiraga aurea*, *C. avellanadae*, *C. ruscifolia*, *C. erinacea*, *C. jussieui*, *C. parviflora*, *Dasyphyllum brasiliense*, *Doniophyton anomalum*, *D. weddellii*, *Duseniella patagonica*, *Huarpea andina* and *Schlechtendalia luzulifolia* through histological sections and histochemical tests revealed: the expression of premeiotic cellular differentiation (PCD) in archesporocytes and the extension of the PCD gradient to tapetal cells; a dicotyledonous type of microsporangium wall development; and the multiplication of archesporocytes for the subfamily. The presence of both types of tapetum, periplasmodial and secretory, was also observed, its double origin was corroborated, and a polarization syndrome of the secretory tapetum was described. The ontogenetic sequence of appearance of the layers of the sporodermis was described, its composition with a

polysaccharide and protein primexin and endexin, and its structure was corroborated with mono, 2- or 3-layered ectexin and presence or absence of caveas.

The storage substances of pollen grains were studied for the first time for this subfamily, revealing that there are starchy and starchless species, a condition probably related to the pollination vector.

A complex system of tissue interaction during anther dehiscence is described for the first time for Barnadesioideae, in which, in addition to the endothecium, the connective tissue, the epidermis and the connective hypodermis participate, and the differential participation of the tissues in this mechanism is described. where the endothecium of the external locules presents thickening and a different mechanics than that of the internal locules.

Using the same techniques of histological sections and histochemical tests, stages of development of the ovaries and ovules of *Barnadesia arborea*, *B. odorata*, *Chuquiraga ruscifolia*, *Doniophyton weddellii*, *Duseniella patagonica* and *Huarpea andina* were studied; the anatomy of the seed, pericarp and embryo of *Barnadesia polyacantha*; and the storage substances of the embryos of *C. erinacea*, *D. weddellii* and *Duseniella patagonica*.

Ovules are anatropous, unitegumented, incompletely tenuinucellated, and have endothelium, in congruence with what is known for the euasterid clade (Core eudicots: Asterid alliance) and for Calyceraceae. The development of a single massive asymmetric or semi-annular integument 12 to 25 cells thick was confirmed.

The fruit wall has only the exocarp remaining, followed by with up to 8 layers of cells corresponding to the integument of the consumed ovule observed below. Crystals, lysigenous channels or starch grains were found in these layers. A straight, spatulated embryo was observed, with a single layer of endosperm, and storage substances in the cotyledons: proteins as the main storage substance and lipids as the secondary ones.

As a general conclusion, the Barnadesioideae do not have the typical capitulum development and structure of the remaining Asteraceae, as they still retain some characteristics that relate them to the thyrsoid cephalodia of their sister group, the Calyceraceae, such as the presence of a terminal flower, the orientation variable of the flowers towards the axis of the capitula, and observations that suggest a zonation of the inflorescence meristem in a peripheral and a central area. The results obtained contribute to the original idea of Erbar & Leins (2000) and the following works of Pozner *et al.* (2012), Claßen Bockhoff & Bull-Hereñu (2013), Zhao *et al.* (2016) and Elomaa *et al.* (2018) who progressively developed the hypothesis of the evolutionary origin of the Asteraceae capitula from a condensed thyrsoid inflorescence (cephalodium), whose meristem behaves like a floral meristem, both in structure and fractionation, where primordia of the cymose groups are reused to form flowers and the central flower is suppressed.

Regarding floral development, the sequence of initiation of floral cycles that begins with the corolla and places the calyx at different later times is already present in some Calyceraceae and Barnadesioideae. The variable initiation of the pappus and its inception in five alternipetal points would be evidence, according to new results from the field of genetics, of its sepaloïd origin and its homology with the calyx and can be considered a developmental alteration related to the profound modification of the calyx in the Asteraceae (cf. Naghiloo & Claßen-Bockhoff, 2017).

Regarding flower sexuality, the pistillate flowers of Barnadesioideae may have arisen by two different mechanisms: one that stops the normal development of microsporogenesis and another that inhibits the development of staminal primordia. In the Calyceraceae, on the other hand, there are no species with pistillate flowers, only *Acicarpa* combines perfect flowers with staminate ones by interrupting the megasporogenesis process. This is how the sister group of the Asteraceae has species with all their flowers perfect, and andromonoecious species. Gynomonoecy and the presence of sterile flowers, typical of the Asteraceae, is already present in the Barnadesioideae.

Regarding embryological characters, it is possible to recognize that the Barnadesioideae have a normal development of anthers and pollen, which is similar to most dicotyledons. The megasporogenesis and megagametogenesis observed in Barnadesioideae, which would lead to a *Polygonum* type of development, is the most frequent in angiosperms. Results on the anatomy of ovules and seeds agree with what is already known for Barnadesioideae, Asteraceae family and the euasterid clade.

The information suggests that the Barnadesioideae have regular embryological processes common to most angiosperms, and that these processes could have been present in the most recent common ancestor of the Asteraceae, being the starting point for the immense embryological diversification known in the remaining Asteraceae.

Keywords: capitula, embryology, development, flower, inflorescences, meristems, primordia, initial subepidermal cells, archesporous, tapetum, anther, microsporogenesis, microgametogenesis, ovules, embryo, fruit, cypsela.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Familia Asteraceae

1.1.1 Aspectos Taxonómicos y Filogenia

Asteraceae es una de las familias más grandes y diversas de Angiospermas. Representa el 10% de las plantas con flor, con cerca de 25.000 especies agrupadas en 1700 géneros pertenecientes a 13 subfamilias (Mandel *et al.*, 2019). Es una familia cosmopolita, ampliamente distribuida en regiones templadas, y semiáridas de los trópicos y subtrópicos.

Las asteráceas incluyen especies adaptadas a muy diferentes ambientes, con los más diversos hábitos vegetativos, y se caracterizan principalmente por poseer flores agregadas en una inflorescencia indeterminada, condensada, rodeada por un involucre de brácteas (= filarios), llamada “capítulo”. Cada flor se compone de un papus, una corola gamopétala, las anteras connadas con dehiscencia introrsa y presentación secundaria de polen, y un gineceo ínfero bicarpelar con un único óvulo de placentación basal. El fruto es una cipsela y la única semilla es prácticamente exalbuminada con tegumento fino o papiráceo, multiplicativo o no multiplicativo (Schmid, 1986).

Las Asteraceae forman parte del clado MGCA del orden Asterales, junto con las familias Menyanthaceae, Goodeniaceae y Calyceraceae (Lundberg & Bremer, 2003; Olmstead *et al.*, 1992; Gustafsson & Bremer, 1995; Hansen, 1997; Lundberg, 2009; Tank & Donoghue, 2010) soportado por caracteres morfológicos, venas laterales en los pétalos de la corola (Gustafsson & Bremer, 1995), pérdida del haustorio micropilar del endosperma (Cosner *et al.*, 1994), ausencia de haustorio chalazal e integumento grueso y multicapa (Inoue & Tobe, 1999) y moleculares, gen del cloroplasto *ribulosa-bifosfato carboxilasa (rbcL)*, (Chase *et al.*, 1993; Cosner *et al.*, 1994; Olmstead *et al.*, 2000; Soltis *et al.*, 2000; Bremer *et al.*, 2001), siendo las Calyceraceae la familia hermana (Stevens, P. F. 2001 en adelante).

El origen de Asteraceae está relacionado a un evento de duplicación del genoma completo en el ancestro de esta familia (Panero & Crozier, 2016; Soltis & Soltis, 2016). Asimismo se han propuesto como innovaciones clave para la evolución y diversificación de esta familia: la inflorescencia (= capítulo), el fruto (= cipsela anemócora), el mecanismo de presentación secundaria de polen (Soltis & Soltis, 2016), y la presencia de una capa celular pigmentada en la pared del fruto (Panero & Crozier, 2016).

La clasificación más reciente de la familia Asteraceae (Mandel *et al.*, 2019; Susanna *et al.*, 2020) reúne 16 subfamilias: **Barnadesioideae** Bremer & Jansen, **Famatinanthoideae** S.E. Freire, Ariza & Panero., **Stifftioideae** Panero., **Mutisioideae** Lindley., **Wunderlichioideae** Panero & Funk., **Gochnatioideae** Panero & Funk., **Hecastocleidoideae** Panero & Funk.,

Pertyoideae Panero & Funk., **Tarconanthoideae** S. Ortiz., **Dicomoideae** S. Ortiz., **Carduoideae** Sweet, **Gymnarrhenoidae** Panero & Funk, **Vernonioideae** (Cassini) Lindley., **Cichorioideae** Chevallier., **Corymbioideae** Panero & Funk y **Asteroideae** Lindley (Fig. 1).

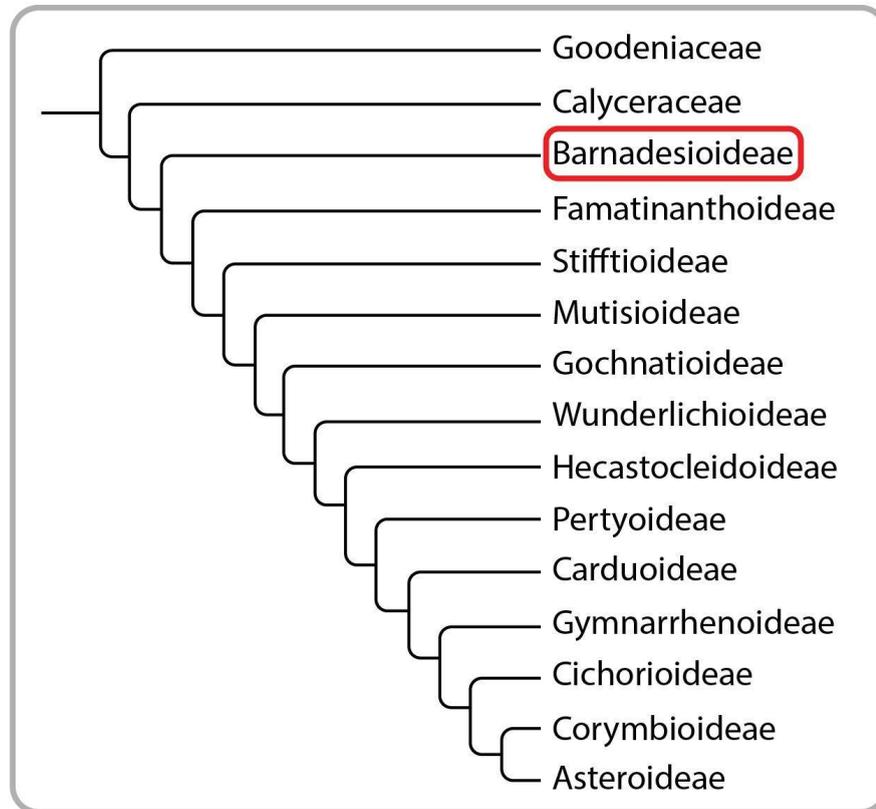


Figura 1 Cladograma simplificado de la Familia Asteraceae (Mandel *et al.*, 2019)

1.1.2 Aspectos embriológicos de Asteraceae

Los procesos embriológicos en Angiospermas abarcan el desarrollo de las anteras y los óvulos, incluyendo no sólo el desarrollo de la pared de la antera, la nucela y los tegumentos sino también la esporogénesis, gametogénesis, fecundación, embriogénesis, endospermogénesis, y el desarrollo del tegumento seminal hasta la estructura de la semilla madura (Johri, 1984). Desde un punto de vista histórico, el estudio de los procesos embriológicos en Angiospermas ha tenido dos enfoques: (1) un enfoque descriptivo con aplicación a la sistemática de taxones supragénicos (ej. Davis, 1966; Tobe, 1989; Johri *et al.*, 1992), y (2) un enfoque “funcional” que permite entender los procesos embriológicos dentro de la interpretación del sistema reproductivo de cada especie (por ejemplo Russell & Jones, 2015). Pero en los últimos años, el avance en la reconstrucción de filogenias robustas sobre la base de caracteres moleculares, ha permitido combinar ambos enfoques (descriptivo-taxonómico y funcional) en una interpretación evolutiva de los sistemas

reproductivos, para desarrollar hipótesis que explican el origen de los rasgos reproductivos que caracterizan géneros, tribus, familias, órdenes, e inclusive clados de mayor rango (por ejemplo Floyd *et al.*, 1999; Friedman, 2006; Friedman & Ryerson, 2009).

En el ámbito de las Angiospermas en general, los procesos embriológicos han mostrado poseer características particularmente uniformes a nivel de familia (Davis, 1966; Tobe, 1989; Johri *et al.*, 1992). Sin embargo, la familia Asteraceae posee una diversidad única de caracteres en sus procesos embriológicos (Pullaiah, 1984; Johri *et al.*, 1992; Pacini, 1996; Franca *et al.*, 2015), como se resume en la Tabla 1.

Proceso / carácter	Tipo
Pared de la antera, desarrollo	Dicotiledóneo o Monocotiledóneo
Tapete, tipo	Secretor o plasmodial (tipos " <i>Sonchus</i> ", " <i>Cosmos</i> ", " <i>Helianthus</i> " y " <i>Cichorium</i> ")
Tapete, células, cantidad de núcleos	2 a numerosos
Células madre de las andrósporas, meiosis	Simultánea o sucesiva
Microsporas, tétrades	Tetrahédricas, isobilaterales, decusadas
Polen, número de células	3 (a veces 2)
Óvulo, tipo	Anátropo
Óvulo, tegumentos, cantidad	1
Óvulo, tegumento, origen	Dérmico o subdérmico
Óvulo, arqueosporio, número de células	1 a numerosas
Megagametofito (saco embrionario), desarrollo	Tipos " <i>Polygonum</i> ", " <i>Allium</i> ", " <i>Adoxa</i> ", " <i>Drusa</i> ", " <i>Peperomia</i> ", " <i>Fritillaria</i> ", " <i>Chrysanthemum</i> "
Endotelio	Diferentes orígenes
Apomixis	Frecuente
Sinérgidas	Normales o haustoriales
Antípodas	Persistentes, normales o haustoriales
Endosperma, desarrollo	Celular o Nuclear
Endosperma, en la semilla	Ausente o residual

Embrión, desarrollo	"Asteráceo"
---------------------	-------------

Tabla 1. Resumen de la diversidad de caracteres de los procesos embriológicos de las Asteraceae (basado en Pullaiah, 1984; Johri *et al.*, 1992; Pacini, 1996; Franca *et al.*, 2015).

Los procesos embriológicos están ampliamente estudiados en Asteraceae en general, con numerosas publicaciones desde los últimos 100 años, sólo la base de bibliografía botánica en línea de los Jardines Botánicos Reales de Kew (<http://kdb.kew.org/kdb/searchpage.do>) recupera 343 registros con las palabras clave "Asteraceae, Compositae, Embryology". El tratado fundacional de la embriología de Angiospermas de Schnarf (1931) ya reúne valiosa información publicada hacia fines del siglo XIX y principio del siglo XX.

La primera caracterización embriológica de las Asteraceae corresponde a Davis (1966), mientras que el primer tratado sobre embriología de Asteraceae es de Pullaiah (1984), escrito sobre la base de los trabajos previos del autor en las tribus Inuleae, Heliantheae y Senecioneae (Pullaiah 1979, 1981, 1983) y de otros autores hasta el momento (Pullaiah, 1984). La última revisión de la bibliografía embriológica de Asteraceae corresponde a Johri *et al.* (1992). Entre los trabajos de embriología publicados posteriormente cabe mencionar Ao *et al.* (2009), Battjes *et al.* (1994), Bonifacio *et al.* (2018), Deng *et al.* (2010), Franca *et al.* (2015), Gotelli *et al.* (2008), Pacini & Keijzer (1989), Sun *et al.* (1987), Yankova-Tsvetkova *et al.* (2016, 2017), Yurukova-Grancharova (2004), Yurukova-Grancharova *et al.* (2006, 2013), Yeung *et al.* (2011).

Sobre la base de la bibliografía citada, la caracterización embriológica de la familia Asteraceae puede resumirse de la siguiente manera: la pared de la antera posee epidermis, endotecio, una sola capa media efímera, y tapete periplasmodial o secretor (con casos intermedios) y células 2-12 nucleadas; el arquesporio es una sola hilera vertical de células subepidérmicas, las células madre de las micrósporas (CMM) sufren meiosis con citocinesis simultánea o sucesiva, y producen tétrades tetrahédricas, isobilaterales, decusadas o lineares, pero no todas las microsporas de una tétrade desarrollan granos de polen (el aborto de granos de polen es frecuente), la morfología polínica es diversa, granos de polen usualmente 3-celulares en el momento de su dispersión. Óvulo anátropo de placentación basal, unitegumentado y tenuinucelado; endotelio con uno o dos estratos de células glandulares de comportamiento diverso (incluso puede producir embriones somáticos), arquesporio usualmente reducido a una célula (hasta 8-10), tétrades lineares o en T, megáspora calazal funcional, ginófito (saco embrionario) de tipos diversos monospóricos, bispóricos o tetraspóricos, antípodas de comportamiento variable 1 a multinucleadas, proliferantes o haustoriales. Endosperma celular o nuclear, reducido a 2-3 estratos en la semilla. Embrión con desarrollo de tipo Asteráceo, a veces hay poliembrionía, son

frecuentes diversos mecanismos apomícticos.

1.1.3 Desarrollo de la inflorescencia y desarrollo floral en Asteraceae

Respecto al desarrollo de la inflorescencia y desarrollo floral, Erbar (1991) realizó estudios ontogenéticos de la subclase Asteridae, incluyendo 30 especies de Asteraceae, enfocándose en el origen de la corola simpétala. Harris *et al.* (1991) estudió la ontogenia de *Erigeron philadelphicus*, de *Lagascea* (Heliantheae) (1994) y luego en otro trabajo de 1995 realizó una síntesis de conceptos históricos e inéditos sobre la ontogenia floral y de la inflorescencia de Asteraceae acompañadas de imágenes fotográficas de microscopía electrónica de barrido (MEB) (para una reseña detallada de la historia de la investigación en este campo ver Harris, 1995). Esta síntesis comprende la iniciación floral y desarrollo temprano de los capítulos de más de 100 especies de Asteraceae de distintas tribus cuyas características ontogenéticas y tendencias generales pueden resumirse de la siguiente manera: el desarrollo es centripeto en capítulos homogamos/isomorfos y bidireccional en heterógamos/heteromorfos (centripeto, para los discos y centrífugo para los radios); hay un atraso en la iniciación de las flores del radio en capítulos heterógamos/heteromorfos; el meristema de la inflorescencia es plano en especies homogamas y turbinado o cónico en heterógamas; los primordios de las flores del disco son redondeados mientras que en las flores del radio pueden ser redondeados en las flores filiformes o triangulares/bilaterales en las flores bilabiadas; los cinco lóbulos de la corola actinomorfa de las flores del disco surgen independientemente en forma simultánea o a partir de un anillo meristemático y, en las corolas bilabiadas/liguladas (3, 4 o 5 lóbulos de los que luego 1 o 2 pueden suprimirse) de las flores del disco son siempre independientes (sin formación de anillo) en forma simultánea o no simultánea; en las flores del radio unisexuales pueden iniciarse de cinco a dos estambres que pueden persistir como estaminodios o abortar y ser reabsorbidos, en las flores filiformes no se observaron primordios de estambres; la iniciación del papus puede ocurrir tardíamente como enaciones, o durante la organogénesis de tres maneras en forma secuencial, surgiendo 5 pelos principales y luego pelos intermedios, en forma azarosa (no secuencial) o a partir de un anillo meristemático.

1.2 La Subfamilia Barnadesioideae

1.2.1 Filogenias y Aspectos Taxonómicos

Bremer & Jansen (1992), elevaron a nivel de subfamilia a la subtribu Barnadesiinae de la tribu Mutiseae basados en la ausencia de la inversión 22kb de ADN de cloroplasto (presente en *Lactuca* y otras Asteraceae) y que origina una dicotomía basal representada por el clado de las barnadesiineas y el clado de las restantes asteráceas. Desde la morfología, las

sinapomorfías de esta subfamilia son el “tricoma barnadesioideo” (simple y bicelular) y comúnmente, la presencia de espinas axilares. Este nuevo posicionamiento significó un hito para la familia Asteraceae, ya que la subfamilia Barnadesioideae, grupo basal, reveló el origen de la familia en América del Sur.

Las Barnadesioideae son exclusivas de América del Sur, y comprenden diez géneros y más de 90 especies de árboles, arbustos, subarbustos y hierbas anuales o perennes (Figs. 2 y 3) (Stuessy *et al.*, 2009). Tres géneros son monoespecíficos, *Duseniella* K. Schum, *Huarpea* Cabrera y *Schlechtendalia* Less mientras que *Archidasphyllum* (Cabrera) P. L. Ferreira, Saavedra & Groppo, *Doniophyton* Wedd (Katinas & Stuessy, 1997) y *Fulcaldea* Poir ex Lam (Roque & Funk 2011) poseen dos especies y *Arnaldoa* Cabrera tres (Stuessy & Sagástegui Alva 1993., Ulloa *et al.*, 2002). Con cerca de 20 especies los géneros *Barnadesia* Mutis ex L. (19 especies, Urtubey, 1999; Hind, 2001) y *Chuquiraga* Juss (23 especies, Ezcurra 1985; Harling, 1991; Sagástegui Alva & Sánchez Vega, 1991; Granda, 1997), y *Dasyphyllum* Kunth con cerca de 40 especies (Cabrera, 1959; Sagástegui Alva, 1980; Sagástegui Alva & Dillon, 1985; Zardini & Soria, 1994; Cabrera, 1997).

Hasta el presente, varias filogenias de la subfamilia tanto morfológicas como moleculares han sido publicadas. La primera filogenia molecular (Gustafsson *et al.*, 2001) delimitó seis clados para la subfamilia: *Barnadesia-Huarpea*, *Dasyphyllum* (como subgénero), *Chuquiraga-Doniophyton*, *Schlechtendalia*, *Archidasphyllum* (como subgénero) y *Arnaldoa-Fulcaldea*. Urtubey & Stuessy (2001) realizaron una filogenia basada en morfología cuyos resultados confirmaron la monofilia de todos los géneros y a *Schlechtendalia* como género basal. Obtuvieron dos grupos principales: (1) *Duseniella*, *Doniophyton* y *Chuquiraga* y (2) *Arnaldoa*, *Barnadesia*, *Dasyphyllum*, *Fulcaldea* y *Huarpea* y confirmaron la monofilia de las dos secciones, *Acanthophylla* y *Chuquiraga* de *Chuquiraga* (Ezcurra, 1985) y de los subgéneros *Archidasphyllum* y *Dasyphyllum* de *Dasyphyllum* (Cabrera, 1959). Gruenstaeudl y coautores (2009) realizaron la filogenia más completa para el grupo hasta el momento utilizando una matriz combinada que indicaron la monofilia de la subfamilia y confirmaron las relaciones intergenéricas presentadas por Gustafsson y coautores (2001) y la afinidad de *Duseniella* con *Chuquiraga* y *Doniophyton*. El género *Dasyphyllum* se mostró bifilético (ubicando a *Archidasphyllum* cercano a *Fulcaldea* y *Arnaldoa*), y sugiriendo la elevación de ambos subgéneros al rango genérico. Los autores apoyaron una separación



Figura. 2. Especies de Barnadesioideae. A-B. *Barnadesia odorata*. **C-D.** *Huarpea andina*. **E.** *Chuquiraga ruscifolia*. **F.** *Chuquiraga oppositifolia*. **G.** *Chuquiraga aurea*. **H.** *Chuquiraga ruscifolia*. **Créditos:** **A-B, E.** Fotos de F. O. Zuloaga. **C-D,H:** Fotos de J. M. Acosta. **F:** Foto de M. Ferreyra. **G:** Foto de L. Zavala. **Cortesía de Flora Argentina.**

evolutiva basal de la subfamilia ubicando al grupo *Chuquiraga-Doniophyton-Dusenella* en un clado diferenciable por su morfología polínica (sin depresiones intercolpares) y su distribución geográfica (áreas secas de los Andes y Patagonia). Mientras que la posición filogenética de *Schlechtendalia* es variable hasta el momento.

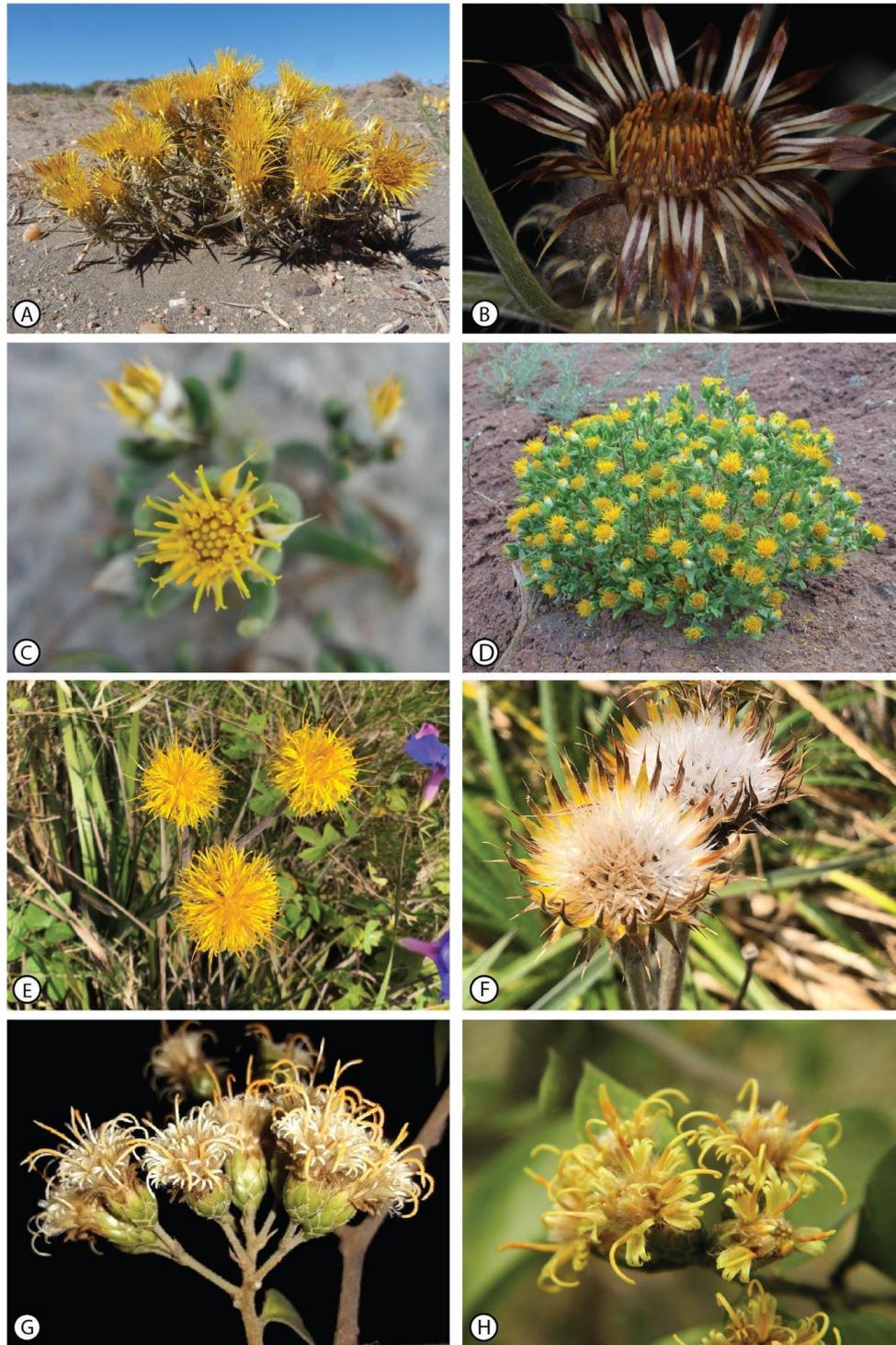


Figura. 3. Especies de Barnadesioideae. A-B. *Doniophyton anomalum* C-D. *Dusenella patagonica*. E-F. *Slechtendalia luzulifolia*. G. *Dasyphyllum brasiliense* var. *divaricatum*. H. *Dasyphyllum inerme*. Créditos: A: Foto de M. Ferreyra. B: Foto de J. M. Acosta. C-F: Fotos de E. Urtubey. G: Fotos de M. Fabbroni. H: Fotos de A. Grau. Cortesía de Flora Argentina.

Cabrera realizó la revisión del género *Dasyphyllum* en el año 1959 y estableció dos subgéneros, *Archidasyphyllum* con hojas uninervias en la base y anteras con apéndices conectivos obtusos o solo emarginados en el ápice (dos especies) y *Dasyphyllum* con hojas trinervias en la base y apéndices conectivos bilobados (34 especies). Este último

subgénero comprende dos secciones, *Microcephala* y *Macrocephala* basadas en el tamaño de los capítulos. Saavedra y coautores (2018) realizaron la revisión taxonómica de *Dasyphyllum* sección *Macrocephala* y redujeron el número de especies de once a seis. Recientemente, Ferreira y coautores (2019) elaboraron la filogenia molecular y elevaron a género al subgénero *Archidasyphyllum* hermano de los géneros *Fulcaldea* y *Arnaldoa*. En ambos estudios las secciones *Dasyphyllum* y *Macrocephala* del género *Dasyphyllum* no son monofiléticas.

Ezcurra (1985) realizó la revisión del género *Chuquiraga* (19 especies) y delimitó dos secciones, *Acanthophylla* y *Chuquiraga*, basadas en la morfología de la lámina de la hoja, y asignó dos series a la sección *Chuquiraga*, *Chuquiraga* y *Parviflorae*, basadas en el tamaño de los capítulos. En el año 2002, la misma autora realizó un análisis de parsimonia del género basado en caracteres morfológicos y el cladograma resultante fue utilizado para interpretar patrones morfológicos, ecológicos y biogeográficos en un contexto histórico estableciendo como centro de origen del género el sur de Sudamérica. Padin y coautores (2015), realizaron una nueva filogenia molecular de *Chuquiraga* basada en cuatro genes moleculares (plastídicos y nucleares) cuyos resultados mostraron al grupo *Chuquiraga-Duseniella-Doniophyton* y a las secciones del género como clados bien soportados, no así a las series de la sección *Chuquiraga*.

Stuessy y Sagástegui en 1993, realizaron la revisión del género de los Andes, *Arnaldoa* (2 especies); Katinas & Stuessy la revisión del género *Doniophyton* en 1996 (2 especies).

Urtubey (1999) delimitó 18 especies para *Barnadesia* y dos subgéneros, *Barnadesia* y *Bacasia*, ambos corroborados posteriormente con información molecular de Gustafsson y coautores (2001) que encontraron que el subgénero *Bacasia* de los Andes Centrales tiene una secuencia ITS muy divergente y ocupa una posición basal en el género.

1.2.2 Los géneros *Archidasyphyllum*, *Arnaldoa*, *Barnadesia*, *Chuquiraga*, *Doniophyton*, *Duseniella*, *Dasyphyllum*, *Fulcaldea*, *Huarpea* y *Schlechtendalia*: La Inflorescencia

El género *Archidasyphyllum* tiene capítulos son discoideos o disciformes, monógamos o heterógamos, solitarios y subsésiles, o numerosos y sésiles dispuestos en espigas terminales. El involucre anchamente acampanado, filarias ovado-lanceoladas, mucronadas, seríceas en el dorso. Receptáculo cerdoso y/o con páleas lineales, sedoso-barbelada. Las flores son isomorfas (30-35 o 20-25), hermafroditas o femeninas por aborto de las anteras (a veces con anteras rudimentarias), con corolas pentasectas con una o dos incisiones profundas. El estilo es glabro, cortamente bifido y papiloso, el papus plumoso y las cipselas largamente vellosas.

El género *Arnaldoa* posee capítulos discoideos homógamos, sésiles y solitarios. El involucreo es acampanado y 8-13 seriado. El receptáculo plano, piloso. Las flores son numerosas (30-95) e isomorfas, hermafroditas con corolas pseudobilabiadas (4+1), de color anaranjado o morado. Posee cinco estambres, las anteras son largamente sagitadas en su base y los filamentos son libres. El estilo es bífido y el papus plumoso. Las cipselas turbinadas o cilíndricas densamente hirsutas.

El género *Barnadesia* se caracteriza por poseer capítulos radiados homógamos o heterógamos, sésiles, o pedunculados, solitarios, geminados o en cimas. El involucreo cilíndrico, acampanado, turbinado. El receptáculo es hueco, plano y piloso. Los capítulos con ocho o trece flores marginales perfectas, isomorfas, con corola bilabiada (4+1) y papus plumoso; y una o tres flores del disco perfectas o imperfectas con corola tubulosa, bilabiada, ligulada (5+0) o subligulada (5+0), con papus variable. Las corolas son de color blanco, rosa, rojo, lila o morado. Los estambres tienen anteras decurrentes en la base, o cortamente sagitadas y los filamentos pueden ser libres o soldados. Las cipselas turbinadas o cilíndricas, villosas. El subgénero *Barnadesia* (17 especies) tiene hojas sésiles o subsésiles, fasciculadas, los capítulos son sésiles o cortamente pedunculados y las flores del disco con papus simple o barbelado. El subgénero *Bacasia* (dos especies) tiene las hojas pecioladas, alternas, los capítulos son pedunculados y las flores del disco con corola tubulosa y papus plumoso.

El género *Chuquiraga* presenta capítulos homógamos, discoideos, sésiles, solitarios o agrupados. El involucreo es cilíndrico, acampanado, turbinado, multiseriado y el receptáculo convexo y piloso. Las flores son desde unas pocas a numerosas (5-100), isomorfas, hermafroditas, de corola tubular, subligulada, ligulada, pseudobilabiada (raramente) o bilabiada. Posee cinco estambres, las anteras son sagitadas en la base y los filamentos libres. El estilo es bífido. Las cipselas turbinadas y villosas y el papus plumoso. Según Ezcurra (1985) el género comprende dos secciones: la sección *Acanthophylla* de lámina acicular, lanceolada o linear y espinas axilares siempre ausentes, y la sección *Chuquiraga* caracterizada por poseer lámina ovada y espinas axilares presentes (raramente ausentes o reducidas) y con dos series, la serie *Chuquiraga*, con capítulos grandes de más de 3 cm de longitud y la serie *Parviflorae* con capítulos medianos a pequeños de menos de 3 cm de longitud.

El género *Dasyphyllum* Kunth sección *Microcephala* posee capítulos pequeños numerosos y agrupados en racimos y el involucreo es de menos de 18 mm. La sección *Macrocephala*, tiene capítulos grandes, solitarios a numerosos, y el involucreo de más de 20 milímetros. Los capítulos son discoideos, homógamos o heterógamos, pedunculados, solitarios o agrupados en cimas corimbiformes o racemiformes. El involucreo es acampanado y el receptáculo es plano, pilosos a veces con páleas aisladas. Las flores son pocas a numerosas, isomorfas,

perfectas o pistiladas (por aborto de estambres). Las corolas son tubulares, tubulares con una incisión profunda ("split"), liguladas, pseudobilabiadas o bilabiadas. Estambres libres insertados en la garganta o entre ésta y la base de la corola, y las anteras cortamente sagitadas con apéndices conectivales emarginados o bilobados. El estilo es cortamente bilobado. Las cipselas turbinadas, cilíndricas, villosas, raramente glabras y el papus plumoso.

El género *Doniophyton* se caracteriza por poseer capítulos discoideos, heterógamos, isomorfos, sésiles, y solitarios. El involucreo es hemisférico o campanulado, filarias 4-5 seriadas. El receptáculo es desnudo, plano o convexo, alveolado o tuberculado, pubescente. Posee numerosas flores (40-135) isomorfas, de corola tubular. Las flores del radio son femeninas, escasas. Las flores del disco son hermafroditas, y poseen cinco estambres, con anteras largamente sagitadas y filamentos libres. El estilo es bifido. Las cipselas turbinadas, densamente villosas y el papus plumoso.

Dusenilla patagonica (O. Hoffm.) K. Schum. posee capítulos discoideos, heterógamos, isomorfos, sésiles, solitarios o en glomérulos poco densos. Involucro campanulado de filarias 4-seriadas. El receptáculo es convexo y desnudo. Posee numerosas flores (20-35) isomorfas con corola tubular. Las flores del radio son femeninas, escasas y las del disco hermafroditas. Cuentan con cinco estambres insertos entre el ápice y la base del tubo de la corola, las anteras son cortamente sagitadas y los filamentos libres. El estilo es bifido. Las cipselas son cilíndricas y villosas y el papus está formado por cerdas lanceoladas

Fulcaldea Poir. con capítulos unifloros reunidos en inflorescencias terminales o axilares. Involucro cilíndrico y estrecho, filarias 10-13 seriadas. Receptáculo convexo, sin páleas, glabro. Las flores son hermafroditas actinomorfas de corola tubular lila, rosa o roja. El estilo glabro se caracteriza por presentar un engrosamiento distintivo debajo de la bifurcación de las ramas estilares. Estambres de filamentos libres, anteras de base truncada. Las cipselas cilíndricas, densamente villosas, papus plumoso.

Huarpea Cabrera con capítulos radiados heterógamos sésiles y solitarios. El involucreo es cilíndrico-acampanado y el receptáculo es plano y piloso. Las flores escasas (6-7) son dimorfas blancas. Las cinco flores del margen llevan corolas pseudobilabiadas (4+1) y son flores perfectas y la única del centro con corola tubulosa y todas llevan cinco estambres de filamentos libres. las anteras son decurrentes en la base. El estilo es cortamente bilobado. Las cipselas son turbinadas y pubescentes. El papus es plumoso en las flores del margen y setáceo o ausente en la flor del disco.

Schlechtendalia luzulifolia Less con capítulos discoideos, homógamos, isomorfos, y pedunculados agrupados en racimos o glomérulos cimosos. El involucreo puede ser anchamente acampanado hasta hemisférico. El receptáculo es plano y piloso. Las flores son numerosas (40-45), isomorfas, hermafroditas y con corola pseudobilabiada. Posee

cinco estambres, anteras cortamente sagitadas y filamentos libres. El estilo es bífido. Las cipselas turbinadas, villosas, y el papus setáceo.

1.2.3 Aspectos embriológicos

A pesar de la gran cantidad de estudios embriológicos generales para las Asteraceae, los caracteres embriológicos de la subfamilia Barnadesioideae son prácticamente desconocidos.

Estudios sobre la megasporogénesis y megagametogénesis de *Dasyphyllum brasiliense* y *Schlechtendalia luzulifolia* (Kurtz da Costa, 2014) corroboran que poseen ovario ínfero, gineceo bicarpelar, gamocarpelar y unilocular, con un único óvulo anátropo, unitegumentado de placentación basal, características diagnósticas de la familia. Sin embargo, indican que el óvulo es tenuinucelado incompleto, el tegumento es asimétrico, el endotelio posee un origen doble (tegumentario y funicular), y se observó un obturador funicular. En ambas especies la degeneración de la epidermis nucelar ocurre durante el inicio de la megagametogénesis.

Respecto al saco embrionario *Dasyphyllum brasiliense* presenta un saco bispórico de tipo *Allium*, y *Schlechtendalia luzulifolia* un saco monospórico de tipo *Polygonum*. En ambas especies las células antipodales degeneran antes de la fecundación. Las sinérgidas del saco embrionario se elongan hacia la micrópila y forman el aparato fibrilar típico de Asteraceae (proyección homogénea de la pared celular primaria que está en contacto con la pared de las células del obturador). La mayor parte de la sinérgidas se introducen en el canal micropilar. El canal micropilar presenta en ambas especies un obturador funicular cuyas células se ligan al aparato fibrilar de las células sinérgidas. La célula media forma en su pared celular proyecciones laberínticas.

Estudios sobre la cipsela de *Schlechtendalia luzulifolia* (Mello *et al.*, 2009) determinan que la especie posee un pericarpo papiráceo, un mesocarpo desagregado y con colapsos celulares, un endocarpo unicelular discontinuo, un haz vascular colateral que va desde el rafe hacia el antirrafe terminando próximo a la micrópila, y caracterizaron a la semilla como exalbuminada y al embrión como axial espatulado continuo con un eje hipocótilo-radícula corto y cotiledones gruesos más largos que anchos.

Finalmente estudios sobre la cipsela de *Dasyphyllum brasiliense* (Kurtz da Costa & Santos de Oliveira, 2011) establecen que la especie presenta un papus plumoso con tricomas bi y tricelulares y glandulares, el fruto con un pericarpo parenquimático no proliferativo y un meso y exocarpo con solo una capa de células y un embrión cotiledonar axial y espatulado con un endosperma representado por una única capa celular.

1.2.4 Desarrollo de inflorescencias y flores

Erbar & Leins (2000) estudiaron el desarrollo floral de *Arnaldoa macbrideana* y observaron ciertas características del desarrollo que establecieron como “primitivas” para Asteraceae como: el arreglo suelto de los primordios florales, especialmente en la parte central del capítulo, y un indumento denso ya desarrollado desde etapas tempranas en esta zona no ocupada, primordios periféricos de menor tamaño que los centrales y atrasados en su desarrollo, la orientación de las flores variable respecto al centro del capítulo, encontrándose la zona lóbulo o inter lóbulo en posición adaxial o abaxial. Respecto al desarrollo floral encontraron que los primordios pasan por tres etapas sucesivas donde su forma cambia de hemisférica a tapón a embudo (al igual que el resto de Asteraceae) y el desarrollo del papus es levemente anterior o simultáneo al desarrollo de la corola.

Kurtz da Costa (2014) en su tesis de maestría estudió la organogénesis floral de *Dasyphyllum brasiliense* y *Schlechtendalia luzulifolia* estableciendo que en *D. brasiliense* el orden de formación de las piezas florales es corola, papus, androceo y gineceo (C-K-A-G) mientras que *S. luzulifolia* difiere en el orden de formación surgiendo corola, androceo, papus y gineceo (C-A-K-G).

1.2.5 Aspectos morfológicos, anatómicos y microcaracteres

Stuessy & Urtubey (2006) realizaron una filogenia basada en caracteres de corola, como tipo y vascularización, definiendo seis tipos presentes en la subfamilia: tubulares, escindidas (*split*), doblemente escindidas (*double split*), liguladas, subbilabiadas y bilabiadas concluyendo que la forma ancestral de corola es la tubular dando origen a dos tendencias evolutivas llevando a la división o *splitting* del tubo o su planación.

Respecto a anatomía y micro caracteres de estambres Pesacreta y Stuessy (1996) estudiaron la autofluorescencia y los engrosamientos de las bases conectivas de 20 especies. Encontraron características como los engrosamientos espirales de la pared, la tendencia a la forma isodiamétrica de las células, y el límite irregular entre la base conectiva y el filamento, estableciendo que este carácter es muy variable para la subfamilia. Svoma y coautores (2019) investigaron la variación de caracteres estaminales en 88 especies de barnadesioideas, incluyendo varios caracteres de las tecas, de las colas de las tecas, base de los conectivos, anteropodio, y filamento mismo. Presentaron una nueva categorización de anteropodios y bases de anteras y dos claves nuevas para su identificación mostrando la amplia variación presente en la subfamilia. Optimizaron seis caracteres estaminales en una filogenia molecular.

Varios autores han estudiado parcialmente la morfología polínica de miembros de la

subfamilia (Wodehouse, 1928, 1935; Parra & Marticorena, 1972; Skvarla, 1977; Gamero, 1985; Lopes & Oliveira, 2015). Urtubey (1997) realiza un estudio del polen del género *Barnadesia*, donde analiza todas las especies y propone dos tipos en base a la distribución de las lagunas: un Tipo I, con patrón radiosimétrico y Tipo II con patrón radioasimétrico. Posteriormente Urtubey & Telleria (1998) estudian la morfología polínica de 59 especies de la subfamilia donde reconocen tres tipos de polen principales, (1) el lofado de *Barnadesia* y *Huarpea*, (2) con depresiones intercolpares en *Arnaldoa*, *Schlechtendalia* y algunas especies de *Dasyphyllum* y (3) sin depresiones en *Chuquiraga*, *Dasyphyllum*, *Doniophyton*, *Duseniella* y *Fulcaldea*. En base a sus resultados realizaron una clave para la identificación polínica y elaboraron hipótesis filogenéticas apoyando la monofilia del clado *Barnadesia*-*Huarpea*, y establecieron un grupo para los géneros *Dasyphyllum*, *Arnaldoa*, *Fulcaldea*, *Barnadesia* y *Huarpea* en base a la posesión de una exina unicapa. Además optimizaron los caracteres en los cladogramas de las filogenias morfológicas propuestas por Bremer (1994) y Stuessy y coautores (1996). Zhao y coautores (2000) estudiaron la ultraestructura (MEB) del polen de 41 especies de Barnadesioideae y reconocieron los mismos grupos que Urtubey & Telleria (1998). Telleria y coautores (2015) realizaron más estudios ultraestructurales y optimizaron los caracteres de morfología polínica sobre los últimos árboles de filogenias moleculares y establecieron una tendencia evolutiva para la estructura de la exina. De acuerdo a sus resultados la exina de la Barnadesioideae evolucionó de un patrón delgado (1 a 3 micrones) con una *foot layer* sólida y columelas libres presente en Calyceraceae, hacia una exina más gruesa (6 a 11 micrones) y bicapa granular en las Barnadesioideae.

Erbar & Leins (2000, 2015) estudiaron la morfología de los estilos y superficies estigmáticas en asteráceas basales e infirieron el tipo de depositación secundaria del polen a partir de esas observaciones. Para la subfamilia Barnadesioideae establecieron cuatro tipos con su correspondiente síndrome de presentación secundaria: estilo de tipo *Arnaldoa* cortamente bífido, glabro, papilado, de ramas estilares de ápices agudos., el tipo *Barnadesia* suave y cortamente bífido, de ramas estilares redondeadas con una protuberancia basal., el tipo *Fulcaldea* con una protuberancia antes de la bifurcación de las ramas estilares siendo estas muy cortas y el tipo *Schlechtendalia* de ramas estilares y una larga zona de papilas epidérmicas prominentes. Respecto a los síndromes de depositación secundaria del polen los autores establecieron dos tipos para la subfamilia: el tipo pistón, presente en los estilos tipo *Fulcaldea* y *Barnadesia* y el tipo depositación/cepillo para los tipos *Schlechtendalia* y *Arnaldoa*.

Galetto (1995) estudió los nectarios y composición del néctar de *Barnadesia odorata*, estableciendo que las tres flores centrales son nectaríferas y que la base del nectario se encuentra embutida en el sector apical naciendo por debajo del nivel de inserción del

papus., la parte superior del nectario forma un anillo alrededor de la base del estilo, no presenta vascularización y está compuesto de parénquima secretor sin espacios intercelulares. La parte superior de la glándula posee estomas. El autor establece que *B. odorata* corresponde a un síndrome de polinización por aves (ornitofilia) o mariposas nocturnas (esfingofilia).

Erbar & Leins (2000) mencionan en *Arnaldoa macbrideana* la presencia de un prominente nectario en forma de copa en el área de transición entre la base estilar y el techo del ovario cuyo néctar es liberado a través de nectarostomas.

2. OBJETIVOS

2.1 Fundamentos

Ya que la familia Asteraceae posee una peculiar diversidad de procesos embriológicos, resultará interesante interpretar esta diversidad en un marco evolutivo. De ese modo sería posible encontrar un sentido biológico a la diversidad embriológica de la familia Asteraceae y, eventualmente, identificar posibles innovaciones clave de su anatomía reproductiva. En el marco filogenético existente de las asteráceas (Mandel *et al.*, 2019) y sobre la importante información embriológica publicada hasta el momento, falta la información embriológica del grupo basal para poder desarrollar un enfoque evolutivo general de la embriología de la familia.

El clado de las MGCA comparte una inflorescencia básica tipo tirso y tirsoide pero el capítulo de las Asteraceae es considerado una innovación evolutiva.

Históricamente el capítulo se ha interpretado como una inflorescencia indeterminada condensada, resultado del acortamiento o supresión de la elongación de sus entrenudos que produce flores laterales en dirección acrópeta y carece de flor terminal (ejs. Small, 1918; Cronquist, 1955).

El estudio del desarrollo y la estructura de las inflorescencias de las Calyceraceae en un contexto evolutivo (Pozner *et al.*, 2012) delinearon por primera vez una hipótesis sobre cómo el capítulo de las Asteraceae pudo haberse originado a partir de una inflorescencia tirsoide por reducción de grupos cimosos laterales. Posteriormente un estudio sobre la diversidad de inflorescencias que clasifican a las mismas sobre la base del comportamiento del meristema, establece que para Asteraceae las flores de un capítulo nacen por fraccionamiento acrópeta/centrípeta del meristema, asemejándose a unidades de meristemas florales, mas que a unidades de inflorescencias (Claßen Bockhoff & Bull-Hereñu, 2013). Estudios genéticos de expresión ectópica de genes *UNUSUAL FLORAL ORGANS* en *Gerbera (GhUFO)* (Zhao *et al.*, 2016) establecen que para Asteraceae, ambas hipótesis son aplicables en los capítulos con flores del radio y del disco, las primeras originándose por reducción de grupos cimosos, y las segundas como resultado de un fraccionamiento del meristema.

Como grupo hermano del resto de las Asteraceae, las Barnadesioideae concentran la mayoría de las características plesiomórficas de esta familia y son diversas en cuanto a la estructura de capítulos pero sólo se conoce información para los capítulos homógamos (y desarrollo de flores) de *Arnaldoa macbrideana* Ferreyra (Erbar & Leins, 2000) que muestran características del desarrollo que difieren del resto de la familia y son consideradas

primitivas por los autores. Una visión más amplia sobre la diversidad de la estructura y el desarrollo de los capítulos y flores en las Barnadesioideae permitirá avanzar hacia una mejor comprensión del origen evolutivo de esta inflorescencia a partir de un ancestro tirsoide, y analizar las relaciones con los capítulos típicos más derivados del resto de las Asteraceae.

La evolución de la función estaminada o carpelada de las flores en Asteraceae es compleja (Torices *et al.*, 2011), existiendo en general una correlación entre la función estaminada o carpelada, la posición de la flor en el capítulo, y la simetría de la corola (Torices & Anderberg, 2009). Algunas especies de Barnadesioideae poseen dimorfismo floral funcional, pues algunas flores marginales de *Doniophyton* y *Duseniella* funcionan como carpeladas, y la flor del disco de *Huarpea* y de algunas especies de *Barnadesia* pueden funcionar como estaminadas o carpeladas (Cabrera, 1951; Stuessy *et al.*, 2009), o ser estériles (Urtubey, 1999). Estudiar las causas embriológicas de este dimorfismo floral funcional incipiente de las barnadesioideas, permitirá comenzar a discutir homologías con el dimorfismo floral presente en Asteraceae más derivadas.

Una caracterización general del desarrollo de anteras y estudios ontogenéticos puede ampliar el conocimiento acerca de la morfología y función de anteras y tejidos gametofíticos, y ubicar a estos procesos es un nuevo contexto. La visión clásica de linajes celulares que establece que células de un mismo origen tienen un mismo destino (Davis, 1966; Goldberg, 1993), puede ser ampliada y contemplar observaciones más modernas sobre diferenciación celular premeiótica y mecanismos de selección celular de las arqueósporas que interpretan que el destino celular no depende del linaje sino de la interacción genoma-ambiente (Pozner, 2001). Mientras que estudios ontogenéticos e histoquímicos de la esporodermis y grano de polen en Barnadesioideae pueden contribuir con caracteres morfológicos para análisis taxonómicos y sistemáticos del grupo.

Las cipselas anemócoras son una de las innovaciones clave de Asteraceae (Panero & Crozier, 2016). Calyceraceae y Asteraceae se distinguen por el cáliz piloso-plumoso vs. sepaloideo; la pared del fruto, de gruesa y parenquimática vs. delgada y más o menos esclerosada; el endosperma, de celular vs. nuclear, ausente o residual; el embrión no reservante vs. reservante; y las sustancias de reserva almidón vs. aceites, (Reiche, 1900; Muradian 1991; Tobe & Morin, 1996). En consecuencia, para comprender la evolución del fruto de Asteraceae es necesario estudiar la anatomía y estructura de la semilla madura y los ovarios y óvulos, que como los precursores en el desarrollo de las semillas, son órganos de central importancia para entender a éstas (Endress, 2011).

2.2 Objetivo general

Contribuir al conocimiento del desarrollo de las flores e inflorescencias, de los procesos embriológicos de esporogénesis y gametogénesis (en particular de la generación masculina), y de la estructura del óvulo (con énfasis en los tejidos esporofíticos) y la semilla (en cuanto al tipo de sustancia de reserva y el tejido de acumulación) de Barnadesioideae, como un paso previo y necesario para contribuir a la interpretación de la evolución de estructuras reproductivas (inflorescencia, dimorfismo floral, fruto y semilla) y de los procesos embriológicos particularmente diversos en la familia Asteraceae.

2.3 Objetivos específicos

- (1) Estudiar el desarrollo de las inflorescencias de Barnadesioideae.
- (2) Estudiar el desarrollo de las flores de Barnadesioideae.
- (3) Estudiar el desarrollo de las anteras, la microsporogénesis y microgametogénesis de Barnadesioideae.
- (4) Estudiar la anatomía e histoquímica de las anteras y los granos de polen en Barnadesioideae.
- (5) Estudiar las sustancias de reserva (hidratos de carbono, lípidos, proteínas) de las microsporas/granos de polen durante el desarrollo de Barnadesioideae.
- (6) Sobre los resultados de los puntos (2) y (3) identificar las causas embriológicas del dimorfismo floral funcional en *Doniophyton*, *Dusenilla*, *Huarpea* y algunas especies de *Barnadesia*.
- (7) Estudiar la anatomía de los ovarios y óvulos de Barnadesioideae
- (8) Estudiar la anatomía del embrión, el endosperma y el tegumento seminal (y su integración en la estructura de la semilla madura) de Barnadesioideae.
- (9) Estudiar las sustancias de reserva (hidratos de carbono, lípidos, proteínas) de la semilla y el fruto maduros de Barnadesioideae.
- (10) Proponer la primera caracterización embriológica de las Barnadesioideae sobre la base de un muestreo representativo de sus géneros.
- (11) Proponer hipótesis sobre evolución de caracteres para que sean contrastadas más adelante a medida que se complete el estudio de más especies.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El procesamiento y análisis del material fue realizado en el Laboratorio de Anatomía Vegetal del Instituto de Botánica Darwinion. El material biológico fue recolectado en viajes de campaña durante el período 2017-2019 (material de referencia depositado en el Herbario SI). También se pudo recuperar material del Herbario del Instituto Darwinion (SI) que fue rehidratado previamente a su utilización. Los materiales fueron colocados en solución fijadora FAA al 70% durante al menos una semana antes de su utilización.

Para la observación de preparados histológicos se utilizó el microscopio del Laboratorio de Anatomía Vegetal del IBODA Zeiss Standard 18 y la captura de fotografías se realizó con cámara Nikon y software NIS Elements, en un microscopio Nikon FXA (North, 2006; Rossner & Yamada, 2004; Leong *et al.*, 2003). Las observaciones con microscopía de fluorescencia se realizaron con el Equipo Nikon FXA. Para la confección de láminas se utilizaron Adobe Photoshop y Adobe Illustrator

3.1. Preparación de muestras para la observación con microscopía de campo claro

3.1.1 Inclusiones en parafina

Para la inclusión en parafina se siguió el protocolo de D'Ambroggio De Argueso (1986) para la deshidratación y clarificación y el protocolo de Steven E. Ruzin (1999) y para la infiltración xileno/parafina. El material fue embebido en parafina Paraplast. Las secciones fueron cortadas en micrótopo rotativo de 4-12 μm de espesor y teñidos con Safranina - Fast Green. Se utilizó medio de montaje marca Histomount.

3.1.2 Inclusiones en resina

Para obtener inclusiones en resina el material diseccionado de anteras, óvulos y semillas fue puesto en tubos Eppendorf de 2 ml en solución fijadora FAA al 70% y sometido a vacío parcial (ca. 600 mm Hg) durante al menos 3 días. Posteriormente se procedió a su deshidratación con una serie creciente de etanol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), siendo el alcohol absoluto cambiado al menos dos veces durante un lapso de 24 horas. Las muestras luego fueron colocadas en solución de pre infiltración de partes iguales de alcohol absoluto y resina acrílica (Kit de Resina Technovit 7100, Kulzer) (Gerrit & Smid, 1983) durante al menos tres días en los que fueron sometidas a vacío parcial mediante bomba de vacío y puestas en un mezclador rotatorio (Rotator Mixer marca Arcano KSMR-IVA). Luego fueron colocadas en resina pura, y el proceso de vacío y rotación fue repetido durante 3 días. Para montar los bloques de resina se procedió a mezclar la resina con el polimerizador del kit

Technovit en la medida indicada.

Las anteras fueron colocadas dirección longitudinal en moldes de plástico descartables marca Leica de 1 ml de volumen. Los bloques fueron colocados en un polimerizador de luz UV por aproximadamente 5 minutos y luego trasladados a estufa a 40 °C durante 20-30 minutos. Finalizada la polimerización, los bloques se desmoldaron, se cortó la resina excedente y las piezas de material incluido se colocaron nuevamente en moldes descartables de 0,2 ml de volumen. Se procedió a repetir el proceso de secado en la estufa. Finalmente los bloques fueron desmoldados y pegados a cubos de madera con adhesivo instantáneo marca Loctite.

Secciones finas de 0,5 a 5 micrones de espesor fueron obtenidas con micrótomo rotatorio Leica Jung 2055, equipado con navajas descartables Leica y mecanismo de avance con retracción.

Las secciones microtómicas obtenidos fueron suspendidas en agua a temperatura ambiente, hasta su hidratación y expansión, y luego montadas en portaobjetos de vidrio y secadas en placa termostatzada a 60 grados. Para la confección de preparaciones histológicas permanentes las secciones se contrastaron metacromáticamente con Azul de Toluidina 0,05% en Solución Buffer Fosfato de pH 4,1 (O'Brien *et al.*, 1964; O'Brien & McCully, 1981; Zarlavsky, 2014) y se utilizó como medio de montaje Barniz Vitral incoloro de marca Acrilex (Paiva *et al.*, 2006).

3.2 Preparación de muestras para la observación con microscopio electrónico de barrido

Para el estudio de desarrollo de inflorescencias completas se utilizaron principalmente imágenes de microscopio electrónico de barrido (MEB) y se utilizó el servicio de Microscopía del Museo Bernardino Rivadavia (MACN) y el servicio del Museo de Ciencias Naturales de La Plata (UNLP).

Se recuperaron inflorescencias de material de herbario del IBODA (SI) que fueron rehidratadas bajo un tratamiento donde se las colocó en estufa a 40°C durante 24 a 48 hs en solución de agua destilada y humectante fotográfico preparado al 1%. Estas inflorescencias previamente rehidratadas fueron fijadas en FAA 70%, al menos durante 48 horas antes de ser procesadas.

Para realizar las observaciones en microscopio electrónico de barrido (MEB) las inflorescencias fijadas previamente en FAA fueron tratadas de la siguiente manera: (1) en aquellas maduras y con gran número de filarias se procedió a retirar una parte de ellas para facilitar la penetración de los líquidos deshidratantes; (2) se colocó cada capítulo en tubos Eppendorf de 2ml de volumen y se procedió a la deshidratación de los mismos mediante una serie gradual de soluciones de etanol creciente de 70%, 80%, 90%, 96% y 100%, (3) se

repitió el baño en alcohol etílico absoluto hasta 3 veces, (4) se colocaron una o varias muestras (según el tamaño de la muestra y espacio libre de los tubos) en tubos eppendorf de 1,5 ml y 1 ml previamente perforados (5) que fueron depositados en un tubo de rollo fotográfico conteniendo alcohol 100%, (6) posteriormente las muestras fueron llevadas al Museo Bernardino Rivadavia (MACN) y secadas en un equipo Electron Microscopy Science EMS 850, metalizados en Sputter Coater marca Thermo VG Scientific SC7620 y las observaciones hechas en el microscopio electrónico de barrido Philips XL30.

Se realizó secado por punto crítico en el servicio de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata (FCNyM, UNLP), donde se siguieron los mismos procedimientos de deshidratación, excepto que luego de los baños de etílico absoluto se colocaron los materiales en acetona y se utilizaron Punto crítico Baltec Modelo CPD 30, Metalizador Jeol JFC 1100. Una vez seco, los materiales se montaron sobre chapas de aluminio de 1 cm de diámetro sobre las que se colocó una gota de esmalte transparente mezclado con una pequeña cantidad de polvo de grafito para su observación hechas en el microscopio electrónico de barrido marca Jeol 6360 LV.

3.3 Métodos histoquímicos aplicados a anteras y semillas

Se utilizaron las siguientes coloraciones: Ácido periódico-Reactivo de Schiff (PAS) para polisacáridos totales (O'Brien & McCully, 1981); solución de IKI Lugol para almidón (Johansen, 1940); Azul de Bromofenol 0,1% en solución de Cloruro de Mercurio 10% (Contin Ventrella *et al.*, 2013) para proteínas totales (Southworth, 1973), Azul brillante de Comassie R250 0,25% en solución de ácido acético al 7% (Contin Ventrella *et al.*, 2013) para proteínas totales (Southworth, 1973). Rojo de Rutenio para ácidos polisacáridos y ácidos pécticos (Johansen, 1940); Sudan Black, Sudán III y Sudán IV para localización de lípidos (Contin Ventrella *et al.*, 2013); Auramina O en concentración 0,01% en solución buffer TRIS HCL (Heslop-Harrison, 1977; Nepi & Franchi, 2000) seguido de excitación con luz ultravioleta (filtro 380-340 nanómetros) para localización de lípidos incluyendo ceras (esporopolenina, orbículos y membrana peritapetal); Rojo Neutro al 1% en solución Buffer Fosfato de Sodio 0,1M pH 6,5 (Contin Ventrella *et al.*, 2013), seguida de excitación con luz ultravioleta (filtro 380-340 nanómetros) para detección de lípidos estructurales como cutículas o para lípidos de reserva como gotículas lipídicas; Fucsina Básica en concentración 0,05% para identificación de ectexina y endexina (Faegri & Iversen, 1964; Punt *et al.*, 2007). Para la confección de láminas permanentes fue utilizado como colorante básico el colorante metacromático Azul de Toluidina en concentración 0,05% en Solución Buffer Fosfato de pH 4,1 (O'Brien & McCully, 1981). Los preparados teñidos con Sudanés fueron montados en medio hidratado tanto de glicerina como agua. El resto de las tinciones fueron montadas en Barniz Vitral incoloro Acrilex (Paiva *et al.*, 2006).

	<i>Especificidad</i>	<i>Primexina</i>	<i>Intina</i>	<i>Endexina</i>	<i>Ectexina I</i>
Auramina O	<i>Lípidos (incluyendo ceras)</i>	-	-	+	+++
Rojo Neutro	<i>Lípidos (UV)</i>	-	-	+++	+
Azul de Toluidina	<i>Ácidos pécticos (purpura), grupos ácidos polianiónicos (azul), compuestos fenólicos (azul verdoso).</i>	<i>Purpura /Violeta</i>	<i>Purpura /Violeta</i>	<i>Azul</i>	<i>Celeste</i>
PAS	<i>Polisacáridos insolubles</i>	+++	+++	-/+	-
Rojo de Rutenio	<i>Pectinas</i>	+++	+++	-	-
Azul de Comassie	<i>Proteínas totales</i>	+	+	-/+	-

Tabla 2. Resumen de Test Histoquímicos y su especificidad y respuesta a la tinción en las capas de la esporodermis. -/+ indican la reactividad a las pruebas histoquímicas, con (-) siendo no reactivo y (+++) muy reactivo.

3.4 Consultas a herbarios y viajes de colecta

Se consultaron las colecciones de la subfamilia Barnadesioideae en los Herbarios del Instituto Darwinion (SI), INTA Castelar (BAB), Museo de La Plata (LP), Museo de Ciencias Naturales de Salta (MCNS) y el Herbario Provincial de San Juan Saile Echegaray. Se realizaron tres viajes de colección durante el trabajo de tesis a la Provincia de San Juan (diciembre de 2017) a la Provincia de Salta (julio de 2018), y a las Provincias de Río Negro y Neuquén (diciembre de 2018).

3.5 Definición de conceptos

3.5.1 Desarrollo de inflorescencias y flores

A continuación se desarrollan conceptos y términos sobre la base de Harris (1995), Claßen-Bockhoff & Bull-Hereñu (2013), y Zhang *et al.* (2021) que se aplican en los presentes resultados.

Meristema de la inflorescencia: Los meristemas de la inflorescencia son de actividad limitada y comparten con los meristemas vegetativos la capacidad de segregar primordios laterales, pero difieren en su tamaño y/o volumen forma y filotaxis (Claßen-Bockhoff & Bull-Hereñu, 2013). De acuerdo a estos autores, el “Meristema de unidades florales” de la familia Asteraceae es un meristema de tipo Open II, es decir sin zona central, que originan muchas flores (como los meristemas de la inflorescencia) pero que se asemejan a meristemas florales por (1) su forma “desnuda”, (2) su organización histológica en

manto-núcleo, y (3) por el tipo de surgimiento de los primordios mediante el fraccionamiento del meristema en subunidades (a diferencia de la segregación de meristemas laterales).

Receptáculo: el receptáculo se forma en la inflorescencia a medida que avanza lo que Zhang y coautores (2021) definieron como el *frente de iniciación de primordios* y consta de la zona donde páleas y/o primordios de flores están diferenciados. El indumento del receptáculo puede desarrollarse al mismo tiempo que los primordios o posteriormente. De acuerdo a Claßen-Bockhoff & Bull-Hereñu (2013), la forma final del receptáculo (planos, levemente cóncavos, extremadamente convexos o cónicos) se adquiere por expansión del meristema de la inflorescencia pero no por un cambio en su forma.

Primordio floral: es un meristema determinado caracterizado por una histología de manto-núcleo que dará origen a una flor por fraccionamiento (Claßen-Bockhoff & Bull-Hereñu, 2013). Según Harris (1995), los primordios florales pasan por dos estados sucesivos de desarrollo: (1) tapón (*plug*) y (2) órgano-generativo o de organogénesis (Fig. 5).

Primordios comunes: son algunos de los primordios de la primera serie de la inflorescencia que se bifurcan equitativamente o no, y pueden originar adaxilamente un primordio floral y abaxialmente una bráctea (filaria o pálea).

Los primordios comunes son inusuales, han sido registrados en pocas familias y documentados en varias especies de Asteraceae (Battjes *et al.*, 1992; Harris, 1991).

Procesos ontogenéticos observables en la inflorescencia en su conjunto: los estadios del desarrollo de los capítulos (Harris, 1995).

Durante el desarrollo de los capítulos se distinguen cuatro estadios: (1) la diferenciación del meristema de la inflorescencia, (2) el fraccionamiento del meristema de la inflorescencia, (3) la organogénesis y (4) el crecimiento zonal. Si bien el meristema se origina en forma simultánea (ocurre al mismo tiempo en todo el ápice caulinar), los estadios siguientes pueden ser simultáneos o progresivos. Los estadios progresivos se caracterizan por la dirección que toma el desarrollo pudiendo ser centrípeto con atraso en las flores del radio, bidireccional o centrífugo.

Los estadios de fraccionamiento del meristema y organogénesis pueden tener la misma o distinta dirección durante el desarrollo de un individuo. En el caso de la organogénesis, existirá una dirección de diferenciación de los verticilos de la flor y otra del capítulo referida aquí como *Progresión de la organogénesis para el capítulo*.

(1) Establecimiento del meristema de la inflorescencia: El ápice vegetativo cambia a su fase reproductiva y se transforma en el meristema de la inflorescencia cuando aumenta de tamaño por ensanchamiento y aplanamiento, y produce filarias en lugar de hojas. Las células del meristema se vuelven densamente vacuoladas. Seguidamente, ocurre una

zonación meristemática que consiste en la división o separación del meristema de la inflorescencia en dos regiones.

(2) Fraccionamiento del meristema de la Inflorescencia: establecimiento de los primordios florales. Este estadio comienza cuando los primordios florales surgen sobre la superficie del meristema de la inflorescencia adoptando forma de tapón (*plug*) y finaliza cuando se expanden lateralmente, ocupando todo el espacio disponible. Hacia el final del fraccionamiento, puede encontrarse receptáculo libre principalmente hacia el centro de la inflorescencia y a veces una disposición caótica de los primordios.

Como ya se dijo, la progresión del fraccionamiento del meristema puede ser simultánea o progresiva en cuyo caso puede proceder en forma centrípeta, centrípeta con atraso en las flores del radio, bidireccional o centrífuga.

-Simultánea: cuando todo el meristema de la inflorescencia se fracciona por completo al mismo tiempo, de modo que los primordios florales surgen simultáneamente. Observada generalmente en los capítulos con escaso número de flores.

-Progresiva: cuando el meristema de la inflorescencia se fracciona de manera progresiva y continua con una o más direcciones. Observada generalmente en los capítulos con numerosas flores, y pueden reconocerse 4 tipos:

Fraccionamiento centrípeta: presente en especies con capítulos discoideos (isomorfos y homógamos). Los primeros primordios surgen en el margen del meristema de la inflorescencia y la iniciación progresa hacia el centro del meristema de la inflorescencia.

Fraccionamiento centrípeta con atraso en las flores del radio: en especies con capítulos radiados o capítulos disciformes con al menos una serie de flores del radio. La iniciación es centrípeta, pero los primordios de las flores del radio entran en un estado de latencia o dormancia que se prolongará hasta que las flores del disco se distancian en el desarrollo.

Fraccionamiento bidireccional: en capítulos con gran cantidad de flores con corolas filiformes. Se inician primero una o varias series de flores del disco desde un “ecuador” del meristema que progresan en dirección centrípeta, y luego comienzan a surgir los primordios de flores del radio en dirección centrífuga. Este patrón también está acompañado por un atraso en el desarrollo de las flores del radio (*ray lag*) durante la iniciación floral y que puede extenderse a la organogénesis.

Fraccionamiento centrífuga: observado en aquellas especies de capítulos radiados (heteromorfos y homógamos) con sólo dos series de flores (radio y disco) y cuyas flores del radio están atrasadas durante la iniciación, la organogénesis o ambas.

(3) Organogénesis: es la producción de órganos en los primordios florales, que sucede en forma centrípeta o irregular (Claßen-Bockhoff & Bull-Hereñu, 2013). Durante este proceso los verticilos florales se diferencian y adquieren su identidad. Esto se denomina “progresión

de la organogénesis en el primordio floral". La organogénesis floral termina cuando los cuatro verticilos están esbozados y los lóbulos de la corola se alargan entran en contacto entre sí cerrando las flores.

En asteráceas el orden de aparición de los verticilos es corola, androceo y gineceo (CAG) siendo la iniciación del cáliz (K) simultánea o posterior al surgimiento de alguno de los otros verticilos pero nunca el verticilo que se forma primero.

La organogénesis floral comienza cuando los primordios expandidos toman forma de embudo (*funnel shape*) y termina cuando todos los órganos están esbozados. En el centro de cada primordio aparece una depresión central que se profundiza progresivamente de modo que cada uno toma, momentáneamente, forma de embudo. A continuación, una constricción transversal surge en el tercio superior de ese embudo, y marcará dos regiones: la región superior originará la corola y la inferior el ovario (para una explicación sobre el origen del ovario hipantial en Asteraceae, ver Leins & Erbar 2010). Una segunda constricción por encima de la primera dividirá la corola de la región del papus; ésta se diferencia externamente de la pared del ovario por carecer de indumento.

Respecto a la iniciación de la corola Harris (1995) establece una clasificación basada en (1) la presencia/ausencia de anillo meristemático previo, y (2) la secuencia de aparición de los lóbulos de la corola ya sea simultáneos o unidireccionales, pero no se seguirá esta clasificación ya que según estudios en el clado de las simpétalas (Erbar, 1991), el anillo meristemático de la corola a partir del cual se diferenciarán los lóbulos está presente en todas las Asteraceae y es el estado de embudo o *funnel stage*. Respecto a la iniciación del androceo, los estambres pueden surgir en forma simultánea, o secuencial ya sea espiralada o unidireccional.

Respecto a la iniciación del papus, ésta puede ser integral con la organogénesis u ocurrir tardíamente (Harris, 1995). Cuando el desarrollo del papus es integral con la organogénesis puede surgir de tres maneras:

-Iniciación secuencial: tres o cinco cerdas principales surgen simultáneamente en posición alternipétala (primera secuencia) seguidos por la iniciación de cerdas secundarias en las zonas intermedias (segunda secuencia).

-Iniciación al azar: las cerdas surgen al azar dependiendo del espacio disponible, generalmente en posición alternipétala y pueden surgir 1-5 cerdas. Puede confundirse con la iniciación secuencial.

-Iniciación a partir de un anillo meristemático del papus: las cerdas se diferencian simultáneamente a partir de un anillo previo. Este estadio se considera más derivado.

En los papus que surgen tardíamente sus cerdas adquieren en la madurez forma de enaciones, escama, arista o corona. En este caso el papus sería un sobrecrecimiento de la

cipsela y no el cáliz modificado, por lo que no sería homólogo de aquellos papus que surgen durante la organogénesis.

En esta tesis se utilizará la palabra “cerdas” para referirse a lo que en taxonomía se denominan “pelos del papus”. Hay varios términos en la bibliografía para referirse al papus, como son: *pappus primordia*, *pappus member*, *pappus bristle* y *pappus hairs*. Se utilizará también la letra K para referirse al verticilo del papus como abreviación de cáliz al utilizarse las fórmulas florales siguiendo las hipótesis más aceptadas hasta el momento que plantean que el papus de asteráceas es de hecho una modificación de los sépalos (Vijverberg *et al.*, 2021).

Respecto al origen del gineceo, no será tomado en cuenta ya que al ser el verticilo más interno no es observable en fotografías de aspecto exterior de los primordios.

El fraccionamiento del meristema y la organogénesis siguen una dirección propia en el capítulo, por lo que debe distinguirse la organogénesis en el primordio floral de la organogénesis en el capítulo. La progresión de la organogénesis en el capítulo puede ser simultánea, es decir todas las flores del capítulo desarrollan el mismo ciclo floral simultáneamente, o puede proceder en sentido centrípeto, bidireccional o estar levemente atrasada en las flores del radio. Durante la organogénesis también pueden surgir los indumentos (tricomas) en corola, ovario y receptáculo.

(4) El crecimiento zonal comienza cuando los primordios florales tienen todos los órganos esbozados y los lóbulos de la corola han crecido hasta tocarse apicalmente cubriendo los restantes verticilos. Es característico de esta etapa el alargamiento de los órganos y la diferenciación de las arqueósporas. En esta etapa también se alargan los indumentos (tricomas) de corola, ovario y receptáculo. En el caso de los papus cuyo desarrollo es tardío (no integral con la organogénesis), aparecen en esta etapa.

3.5.2 Esporangiógenesis, microsporogénesis y microgametogénesis

Esporangiógenesis: proceso de formación de la antera desde su estado indiferenciado como una parte del primordio del estambre hasta el establecimiento de las capas de la pared y de las células que formarán el tejido esporógeno. Se distinguen dos etapas: (1) la diferenciación de las células iniciales subepidérmicas y (2) la segregación de las capas celulares de la antera y de las arqueósporas (Pozner, 2001). Las arqueósporas se distinguen del resto de las células circundantes de la antera primordial por su diferenciación celular premeiótica (DCP, Pozner, 2001). Según Pozner (2001), los términos “arquesporio” y “arquesporio primario” deberían evitarse al hablar de las células iniciales subepidérmicas. Se define al arquesporio como el conjunto de las arqueósporas (conjunto de las células candidatas a experimentar meiosis es decir, a transformarse en meiocitos), pero es posible que algunas arqueósporas no se diferencien como meiocitos y permanezcan somáticas o,

inversamente, que células circundantes (generalmente células del tapete), que por su origen o posición se suponen somáticas, sean alcanzadas por el gradiente de DCP y finalmente se diferencien a meiocitos.

Microsporogénesis: proceso de desarrollo que lleva a la producción de microsporas haploides a partir de una célula madre de las microsporas diploide por meiosis y citocinesis (Furness *et al.*, 2002). Involucra tres etapas: (1) la multiplicación de las arqueósporas por mitosis, aunque puede faltar, (2) la meiosis que comienza cuando las arqueósporas entran en profase I (transformándose en células madre de las microsporas envueltas en calosa) y culmina con la formación de las tétradas de microsporas y (3) segregación de microsporas libres. Durante la microsporogénesis comienza la formación de la esporodermis con la aparición de la primexina que puede entenderse como un molde inicial de la exina constituido por polisacáridos fibrilares y compuestos proteicos, la endexina y la delimitación de las aberturas (colporos). Durante los ciclos finales de multiplicación de las arqueósporas y su diferenciación final a células madre de las microsporas la antera se caracteriza por una disposición laxa de sus capas celulares y los estratos de la pared sufren cambios significativos sobre todo en el tapete que aumenta de tamaño y la capa media que puede reducirse y desaparecer.

Microgametogénesis: comprende desde la vacuolización de las microsporas hasta la liberación del grano de polen, junto con cambios sustanciales en la pared de la antera. Pueden distinguirse hasta seis etapas: (1) vacuolización de las microsporas (grano de polen 1-celular), (2) primera división mitótica que origina la célula gametogénica y la célula sifonogénica (grano de polen 2-celular); (3) englobamiento de la célula gametogénica por parte de la célula sifonogénica y reducción de la vacuola; (4) segunda división mitótica de la célula gametogénica para formar las gametas masculinas (en las especies que liberan polen 3-celular); (5) acumulación de sustancias de reserva en el citoplasma de la célula sifonogénica y (6) deshidratación del grano de polen previa a su dispersión por mecanismos de harmomegata. En la esporodermis progresa el depósito de la ectexina y la intina. Asimismo, la pared de la antera acompaña con la desintegración del tapete y maduración de las capas mecánicas (endotecio y tejido conectivo). Los cambios de la pared de la antera involucrados en la dehiscencia (antesis) comienzan en los primeros momentos de la microgametogénesis y conducen a la maduración del endotecio.

3.6 Taxones estudiados

Especies	Procedencia y datos de herbario
<i>Arnaldoa weberbaueri</i> (Muschl.) Ferreya	Perú, Depto Cajamarca. <i>Stuessy et al 12524 (OS)</i>
<i>Barnadesia arborea</i> Kunth	Ecuador, Imbabura, Depto Cotacachi. Laguna de Mojanda. <i>Urtubey 1260 (SI)</i>
"	Ecuador, Imbabura, Depto Cotacachi. Laguna de Mojanda. <i>Urtubey 1261 (SI)</i>
"	Ecuador, Imbabura, Depto Cotacachi. Laguna de Mojanda. <i>Urtubey 1262 (SI)</i>
<i>Barnadesia odorata</i> Griseb.	Jujuy, Argentina. <i>Acosta 1 (SI)</i>
"	Bolivia, St. Cruz, Valle Grande. <i>Forzza 2328 (SI)</i>
"	Argentina, Salta, La Caldera: Vaqueros, calle de los crespones. <i>Urtubey 1254 (SI)</i>
<i>Barnadesia polyacantha</i> Wedd.	Bolivia, La Paz, Inquisivi: entre Chichipata y Juncumarini. <i>Marko Lewis 37325 (MO)/(LPB)/(SI)</i>
<i>Barnadesia aculeata</i> (Benth.) I.C. Chung	Ecuador, <i>Stuessy 12443 (SI)</i>
<i>Chuquiraga aurea</i> Skottsbo.	Argentina, Santa Cruz Deseado: RN3 <i>Urtubey 601 (SI)</i>
"	Argentina, Santa Cruz, Copen Aike: Ruta Nac. 3, 20 km Sur de San Julián. <i>Zuloaga 14114 (SI)</i>
"	Argentina, Chubut, Dpto: Río Senguer. RN 40. Cañadón de las manos pintadas. <i>Zuloaga 13951 (SI)</i>
"	Argentina, Chubut, de Sarmiento a Comodoro Rivadavia. RP 26. <i>Urtubey 977 (SI)</i>
<i>Chuquiraga avellanadae</i> Lorentz	Argentina, Chubut, Gaiman. RN 25. <i>Urtubey 564 (SI)</i>

"	Argentina, Chubut, Florentino Ameghino. De Camarones a Pt. Madryn. <i>Urtubey 645 (SI)</i>
"	Argentina, St. Cruz. Puerto Deseado. <i>Urtubey 619</i>
<i>Chuquiraga erinacea</i> D. Don subsp. <i>erinacea</i>	Argentina, Río Negro, Conesa: Km 131 de la Ruta 251. <i>Meza Torres 835 (SI)</i>
"	Argentina, Río Negro, Pichi Mahuida: R251 hacia Gral. Conesa. <i>Urtubey 547 (SI)</i>
<i>Chuquiraga erinacea</i> D. Don subsp. <i>hystrix</i> (Don) C. Ezcurra	Argentina, San Juan, Ullum: Camino a la estancia Don Carmelo. <i>Urtubey 1197 (SI)</i>
"	Argentina, San Juan, Iglesia: RN 149. <i>Urtubey 1216 (SI)</i>
"	Argentina, La Rioja, Vinchina: Ruta Provincial 76 de Laguna Brava a Punta del Agua. <i>Zuloaga 12083 (SI)</i>
<i>Chuquiraga jussieui</i> J.F. Gmel.	Ecuador, Pcia. De Cotopaxi. Volcán Cotopaxi. <i>Baztarrica 1 (SI)</i>
"	Ecuador, Pcia. De Cotopaxi. Volcán Cotopaxi <i>Baztarrica 2 (SI)</i>
"	Ecuador, Pcia. De Cotopaxi. Volcán Cotopaxi <i>Baztarrica 3 (SI)</i>
<i>Chuquiraga parviflora</i> (Griseb.) Hieron	Argentina, Tucumán, Depto: Tafi del Valle. RP 307. entre el Infiernillo y Carapunco. <i>Zuloaga 16440(SI)</i>
<i>Chuquiraga ruscifolia</i> D. Don	Argentina, San Juan, Ullum: Camino a la estancia Don Carmelo (a 12 km aprox.) <i>Urtubey 1202 (SI)</i>
"	Argentina, La Rioja, Famatina, Ciénaga Grande. <i>Barboza 3854 (SI)</i>
"	Argentina, La Rioja, Famatina, Sierra de Famatina, Subida a La Mejicana. <i>Salomón 133 (SI)</i> .
<i>Chuquiraga ulicina</i> (Hook. &	Chile, Atacama, Huasco: Comuna de Vallenar. Ruta

Arn.) Hook. & Arn.	C-500 de Carrizalillo a Domeyko. <i>Brignone 64 (SI)</i> .
<i>Dasyphyllum brasiliense</i> (Spreng.) Cabrera.	Brasil. Paraná. Serra Ibitiraquere, Morro Tucum. <i>Barbosa & E. Marinero 1400 (SI)</i>
"	Bolivia, Santa Cruz, Ichilo: <i>M. Nee 40585 (SI)</i>
<i>Dasyphyllum brasiliense</i> (Spreng.) Cabrera <i>var. brasiliense</i>	Argentina, Salta, La Caldera: Cuesta del Gallinato, entre RN 9 y el abra. <i>Urtubey 1257 (SI)</i>
"	Argentina, Salta, La Caldera: Cuesta del Gallinato, entre RN 9 y el abra. <i>Urtubey 1258 (SI)</i>
<i>Doniophyton anomalum</i> (D. Don) Kurtz	Argentina, Mendoza, Malargue. <i>Zuloaga 15225 (SI)</i>
"	Argentina, Catamarca, Depto: Antofagasta de la Sierra. RN 43 de Nacimientos de San Antonio a El Peñón. <i>Zuloaga 16146 (SI)</i>
<i>Doniophyton weddellii</i> Katinas & Stuessy	Argentina, San Juan, Iglesia: Ruta 150, Quebrada del Agua Negra. <i>Acosta 644 (SI)</i> .
"	Argentina, San Juan, Iglesia: PN San Guillermo, camino al mirador. <i>Aagesen 112 (SI)</i>
"	Argentina, San Juan, Depto Iglesia. PN San Guillermo. Agua del Indio. <i>Urtubey 1232 (SI)</i>
"	Argentina, San Juan, Iglesia: PN San Guillermo, bajada desde el mirador. <i>Urtubey 1240 (SI)</i>
"	Argentina, San Juan, Iglesia: PN San Guillermo, quebrada de Las Liebres. <i>Urtubey 1249 (SI)</i>
<i>Duseniella patagónica</i> (O. Hoffm.) K. Schum.	Argentina, Santa Cruz, Deseado: RN3, pasando el cruce a Jaramillo, 8 km S al borde del río Deseado. <i>Urtubey 598 (SI)</i>
"	Argentina, Neuquén, Pehuenches: Ruta 6, pasando Rincón de los Sauces. <i>Urtubey 898 (SI)</i>

"	Argentina, Santa Cruz, Deseado. <i>Urtubey 996 (SI)</i>
"	Argentina, Chubut, Los Altares, Paso de Indios, 247 msm. <i>Urtubey & Baztarrica 1126 (SI)</i>
"	Argentina. Rio Negro: El Chuy, Parque Provincial Valle de la luna Rojo, 283 ms.m. <i>Urtubey & Baztarrica 1127 (SI)</i>
"	Argentina, Rio Negro, General Roca: Área Natural Paso Córdoba. Valle de la Luna Rojo. <i>Iribarren 3 (SI)</i>
"	Argentina, Rio Negro, General Roca: Cinco saltos, camino a Lago Pellegrini. <i>Iribarren 5 (SI)</i>
<i>Huarpea andina</i> Cabrera.	Argentina, San Juan, Depto. Iglesia: Parque Nacional San Guillermo, Los Caserones. <i>Urtubey 1226 (SI)</i>
"	Argentina, San Juan Iglesia, Parque Nacional San Guillermo. <i>Kiesling 8782 (SI)</i>
"	Argentina, San Juan, Iglesia: Pq. Nac. San Guillermo, quebrada de Las Liebres. <i>Urtubey 1248 (SI)</i>
"	Argentina, San Juan, Iglesia: Pq. Nac. San Guillermo. Camino al Mirador. <i>Aagesen 94 (SI)</i>
<i>Schlechtendalia luzulifolia</i> Less.	Uruguay, Maldonado, Piriápolis: Cerro de San Antonio. <i>Urtubey 869 (SI)</i>
"	Uruguay, Montevideo: Cerro de Montevideo. <i>Urtubey 1128 (SI)</i>
"	Uruguay, Montevideo, Cerro de Montevideo, 130 msm. <i>Urtubey & Baztarrica 340 (SI)</i>

4. RESULTADOS

4.1 Desarrollo de inflorescencias y flores

La ontogenia del capítulo de Barnadesioideae fue estudiada en 12 especies pertenecientes a cinco géneros: *Arnaldoa weberbaueri*., *Barnadesia odorata*, *B. aculeata*, *Huarpea andina*, *Chuquiraga avellanadae*, *C. erinacea*, *C. jussieui*, *C. ruscifolia* y *C. ulicina*., *Doniophyton weddellii*, *Duseniella patagonica* y *Schlechtendalia luzulifolia*.

Los resultados aquí presentados reúnen a las especies de acuerdo al tipo de capítulo definido por la morfología de la corola y sexualidad de la flor, es decir, en capítulos discoideos y homógamos , disciformes y heterógamos y radiados y homógamos.

4.1.1 Capítulos discoideos y homógamos

El capítulo discoideo y homógamo está caracterizado por presentar las flores con un tipo de corola y ser hermafroditas. Las corolas pueden ser tubulosas como en *Chuquiraga avellanadae*, *C. erinacea*, *C. ruscifolia*, *C. ulicina*, o subbilabiadas (4+1) como en *Arnaldoa weberbaueri*, *Chuquiraga jussieui*, y *Schlechtendalia luzulifolia*.

Género *Chuquiraga*

Chuquiraga avellanadae tiene el meristema de la inflorescencia plano (Fig. 4 A). La progresión del fraccionamiento del meristema es simultánea y se observan primordios florales de forma hemisférica con receptáculo libre entre ellos (Fig. 4 B). Algunos capítulos pueden presentar un primordio terminal (Fig. 4 B-C). Hacia el final del fraccionamiento los primordios florales aumentan de tamaño hasta llegar al estado de tapón o *plug* (Fig. 4 D). La progresión de la organogénesis en el capítulo es simultánea y desde el comienzo hay tricomas sobre el receptáculo (Fig. 4 E). La progresión de la organogénesis en los primordios florales es corola, cáliz, androceo (C-K-A). Los lóbulos de la corola surgen simultáneamente a partir del anillo meristemático de la corola y el desarrollo del papus es integral con la organogénesis mostrando una iniciación secuencial con tres cerdas principales (Fig. 4 E). Posteriormente sigue el desarrollo de los estambres (Fig 4 F). Al final de la organogénesis, los lóbulos de la corola se cierran y todas las cerdas del papus están diferenciadas. En el caso que haya flor central el papus de esta flor está más avanzado. Los ovarios de las flores marginales carecen de tricomas en este estadio y hay tricomas de la corola muy incipientes sólo en la flor central (Fig. 4 G). Durante el crecimiento zonal las cerdas del papus se alargan y los tricomas de la corola crecen en todas las flores (Fig. 4 H).

En *Chuquiraga erinacea*, el meristema de la inflorescencia es convexo. La progresión del fraccionamiento del meristema es centrípeta y se observan primordios florales de forma hemisférica y primordios comunes (Fig. 5 A-B), sin receptáculo libre entre los mismos. Algunos capítulos pueden presentar un primordio terminal de mayor tamaño y más elevado (Fig. 5 C-D) o puede haber ausencia de primordio terminal y en su lugar receptáculo libre (Fig. 5 E). Respecto a la organogénesis, esta no pudo ser observada en sus estadios iniciales y medios. Cuando los lóbulos de la corola se han cerrado, se observa el papus desarrollado, más avanzado en la flor central (en caso de haberla), y tricomas incipientes en el receptáculo (Fig. 5 F). La iniciación del papus es integral con la organogénesis y secuencial. Al final de la organogénesis, los lóbulos de la corola se cierran y todas las cerdas del papus están diferenciadas en la flor central, el ovario es glabro y el receptáculo muestra abundantes tricomas (Figs. 5 G-H, 6 A).

Durante el crecimiento zonal las cerdas del papus se alargan y los tricomas de la corola y el ovario están muy desarrollados (Fig. 6 B).

En *Chuquiraga jussieui* el meristema de la inflorescencia es plano. La progresión del fraccionamiento es centrípeta y se observan primordios florales de forma hemisférica con receptáculo libre entre ellos (Fig 6 C-D).

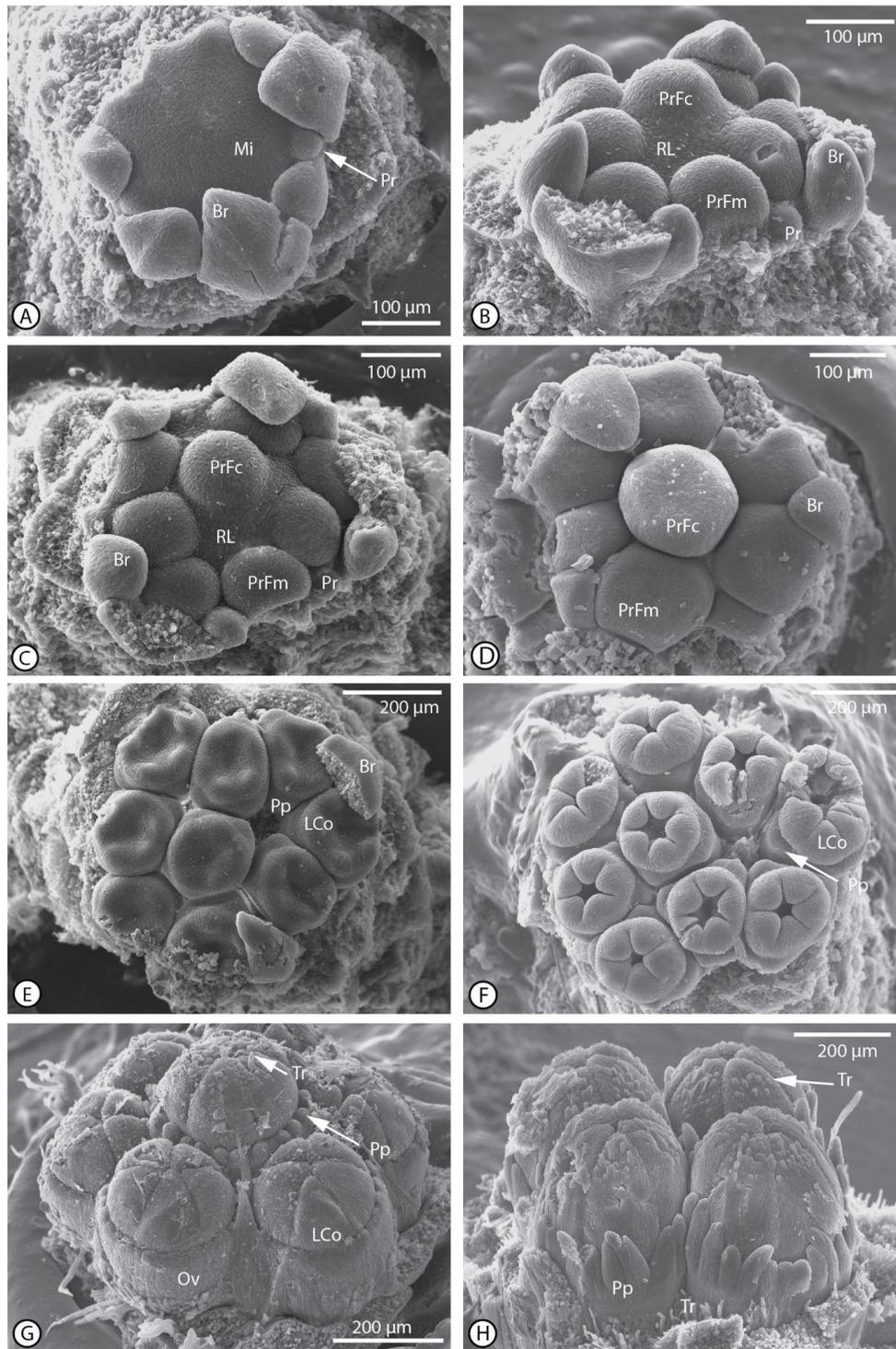


Figura 4 Desarrollo de inflorescencias y flores de *Chuquiraga avellanadae*. **A-D** Fraccionamiento del meristema de la inflorescencia. **A**. Meristema plano y brácteas (varias series removidas). **B**. Primordios florales (8) en vista lateral. Receptáculo libre. **C**. Primordios florales en vista polar. **D**. Vista polar de los primordios en estado de tapón (6 marginales y 1 central). **E-G** Organogénesis. **E**. Primordios florales en estado de embudo (plug), lóbulos de la corola diferenciados y cerdas del papus incipientes. **F**. Corola diferenciada, estambres incipientes y papus diferenciado. **G**. Fin de la organogénesis, verticilos diferenciados, corola con indumento y aquenio glabro. **H**. Crecimiento zonal. Papus elongado. **Br**: bráctea. **Es**: estambres. **Co**: corola. **LCo**: lóbulo de corola. **Pp**: papus. **Ov**: ovario. **Tr**: tricomas. **Br**: bráctea. **Mi**: meristema de la inflorescencia. **Pr**: primordio. **PrFc**: primordio floral de flor central. **PrFm**: primordio floral de flor marginal. **RL**: receptáculo libre.

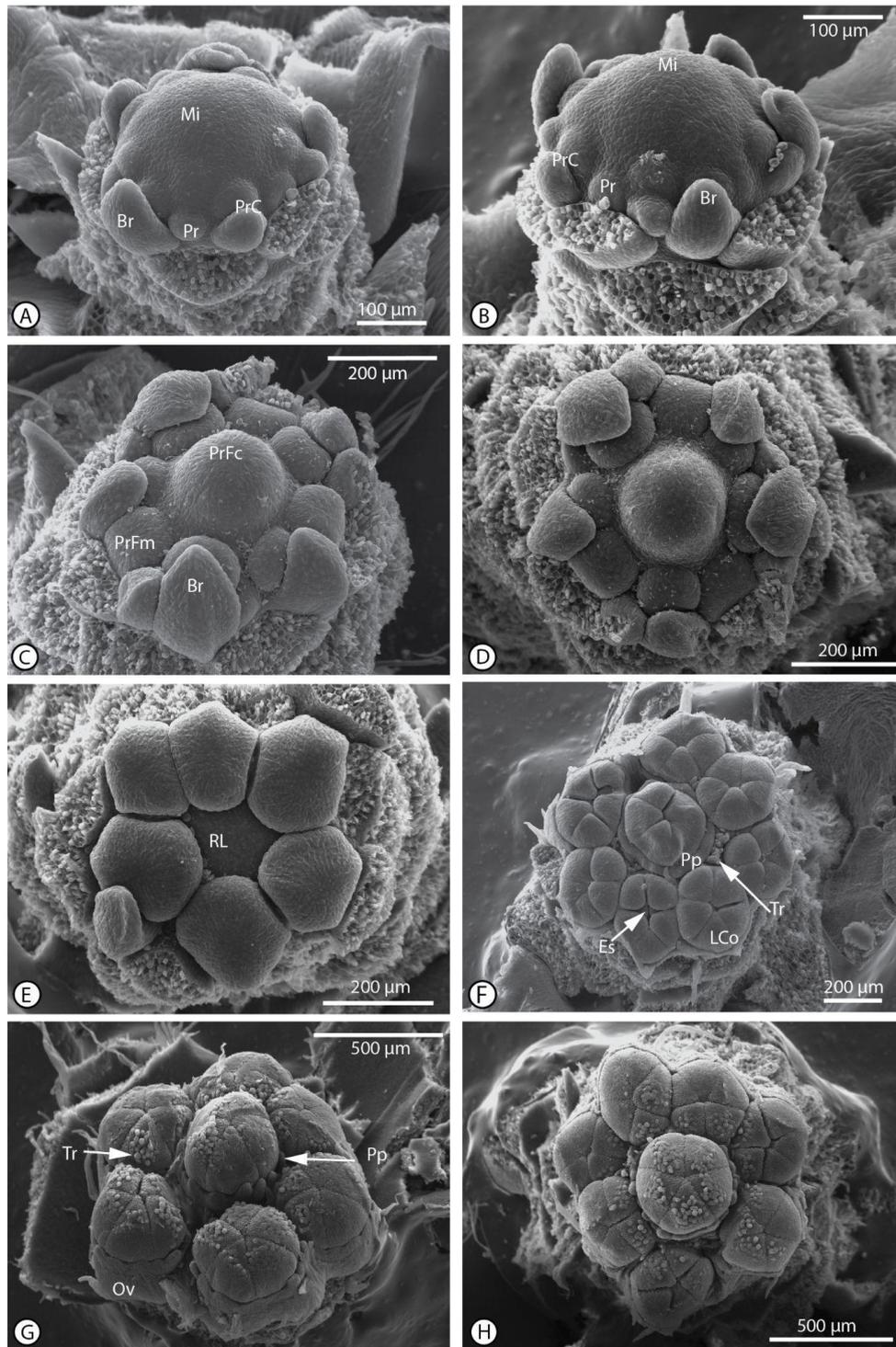


Figura 5 Desarrollo de inflorescencias y flores de *Chuquiraga erinacea*. **A-E. Fraccionamiento del meristema de la inflorescencia** A. Meristema convexo y primordios comunes. B. Primordios comunes. C. Fin del fraccionamiento, capítulo con flor central. D. Vista polar. E. Capítulo sin flor central, receptáculo libre. **F-H Organogénesis.** F. Corola diferenciada, estambres incipientes y papus diferenciado. G. Papus más desarrollado en flor central. Ovario glabro. H. Corola con tricomas incipientes. Br: bráctea. Es: estambres. LCo: lóbulo de corola. Mi: meristema de la inflorescencia. Ov: ovario. Pp: papus. Pr: Primordio. PrC: primordio común. PrFc: primordio de flor central. PrFm: primordio de flor marginal. Tr: tricomas.

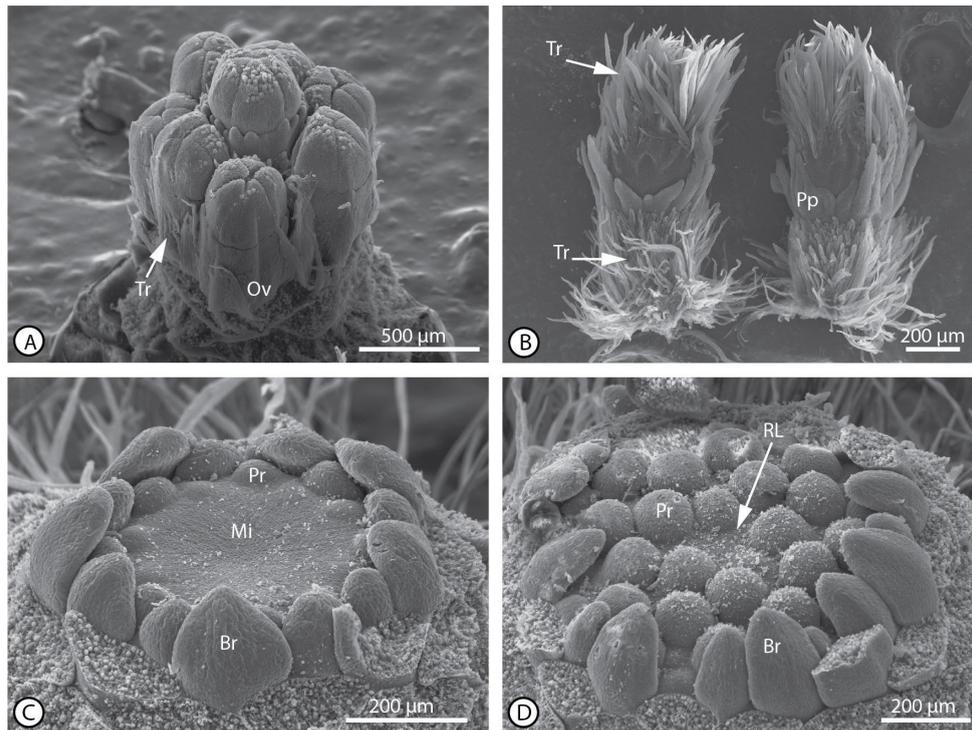


Figura 6. Desarrollo de inflorescencias y flores de *Chuquiraga erinacea*. A Organogénesis. Capítulo con flor central y ovario pubescente. **B. Crecimiento zonal.** Flores del margen aisladas. Tricomos y cerdas del papus elongados. **C-D. *Chuquiraga jussieui*. Fraccionamiento del meristema de la inflorescencia.** C. Meristema plano con primordios marginales incipientes. D. Fin del fraccionamiento, receptáculo libre. **Br: bráctea. Mi: meristema de la inflorescencia. Pr: primordio. RL: receptáculo libre. Tr: Tricomos. Ov: ovario. Pp: papus.**

En *Chuquiraga ruscifolia* la progresión de la organogénesis en el capítulo es centrípeta y no hay tricomas sobre el receptáculo para ese momento. La progresión de la organogénesis en los primordios florales es corola, androceo, cáliz (C-A-K) (Fig 7 A-B) con un desarrollo muy tardío del papus (Fig. 7 C-D) que es por lo tanto integral con la organogénesis y secuencial. Al final de la organogénesis, los lóbulos de la corola están cerrados y presentan tricomas incipientes (Fig. 7 E). Durante el crecimiento zonal se alargan las cerdas del papus y los tricomas de las corolas. Los lóbulos de la corola vuelven a abrirse por el empuje que ejercen los verticilos interiores (androceo y gineceo) y se observan los dos carpelos desarrollados (Fig 7 F-H).

Chuquiraga ulicina tiene el meristema de la inflorescencia plano y cuando el fraccionamiento del meristema está completo se observan primordios florales de forma hemisférica en estado de tapón o *plug* sin receptáculo libre entre ellos (Fig 8 A). La progresión de la organogénesis en el capítulo es centrípeta y no se observan tricomas en el receptáculo (Fig 8 B). La progresión de la organogénesis en los primordios florales es corola - androceo - cáliz (C-A-K) (Fig 8 B). Los lóbulos de la corola surgen simultáneamente a partir del anillo meristemático. Al final de la organogénesis los lóbulos de la corola están cerrados, todas las cerdas del papus diferenciadas (con distinta longitud) y corola y ovario presentan tricomas

muy incipientes (Fig. 8 C). El origen del papus es integral con la organogénesis y secuencial. Durante el crecimiento zonal el papus y los tricomas se elongan (Fig 8 D).

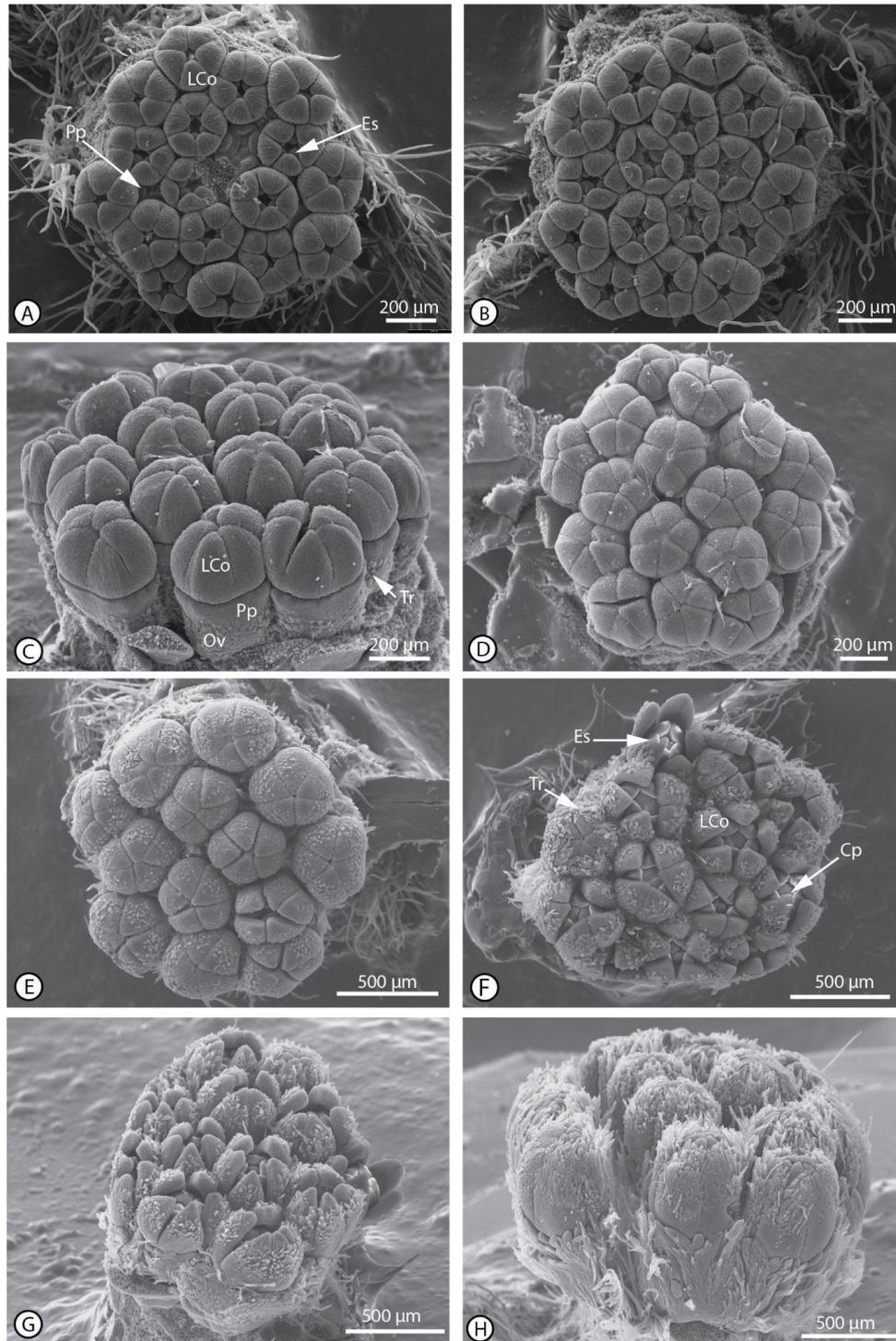


Figura 7 Desarrollo de inflorescencias y flores de *Chuquiraga ruscifolia*. A-D. Organogénesis. A. Progresión de la organogénesis del capítulo centripeta. **B.** Mayor desarrollo, estambres conspicuos. **C.** Organogénesis completa. Ovario con tricomas. **D.** Vista polar de la inflorescencia, primordios cerrados. **E-H. Crecimiento zonal. E.** Corola con tricomas incipientes. **F-G.** Primordios florales abiertos mostrando estambres y carpelos. Tricomas elongados. **H.** Tricomas desarrollados. Papus con cerdas de distinta longitud. **Cp:** carpelos. **Es:** estambres. **LCo:** lóbulo de corola. **Ov:** ovario. **Pp:** papus. **Tr:** tricomas.

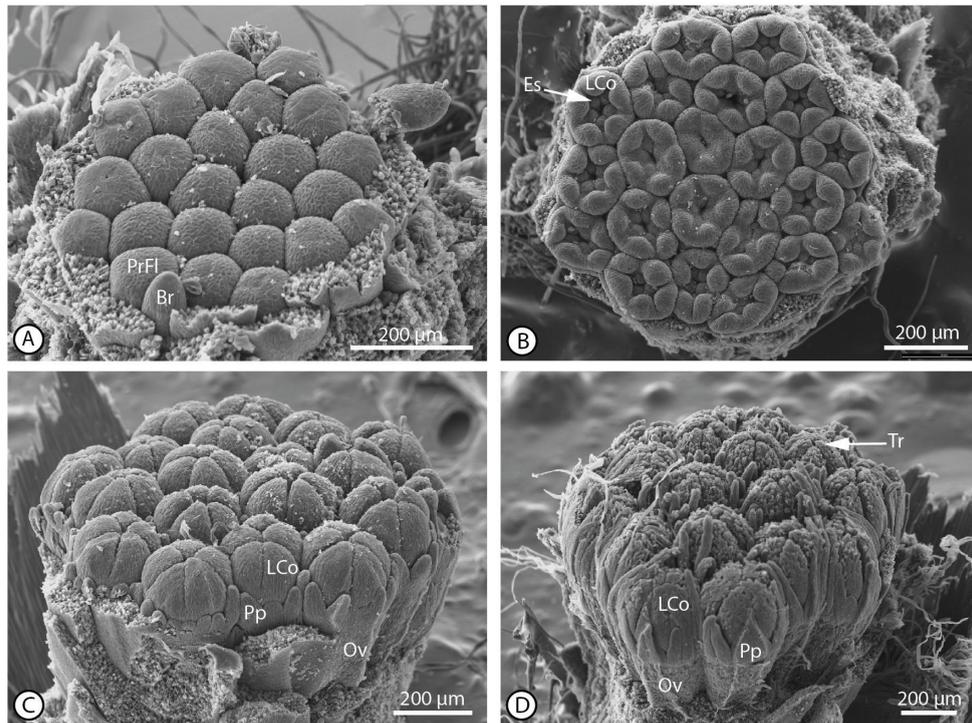


Figura 8 Desarrollo de inflorescencias y flores de *Chuquiraga ulicina*. A. Fraccionamiento del meristema de la inflorescencia. A. Primordios en estadio de tapón. B-C. Organogénesis. B. Progresión de la organogénesis del capítulo centripeta, estambres incipientes. C. Organogénesis completa, primordios cerrados. Papus con cerdas alternipétalas más desarrolladas. D. Crecimiento Zonal. Papus lanceolado y agudo elongado y corola con indumento. Br: bráctea. Es: estambres. LCo: Lóbulo de corola. Ov: ovario. Pp: papus. PrFl: primordio floral. Tr: tricomas

Género *Arnaldoa*

En *Arnaldoa weberbaueri* el meristema de la inflorescencia es plano (Fig 9 A, B). Puede identificarse el meristema debido al aumento en la fracción filotáctica con respecto a la normal para un eje vegetativo.

Género *Schlechtendalia*

Schlechtendalia luzulifolia tiene un meristema de la inflorescencia convexo (Fig 9 C). La progresión del fraccionamiento del meristema es centripeta y se observan primordios florales marginales subtriangulares y poligonales y primordios comunes (Figs 9 D, G), a medida que el fraccionamiento avanza, los primordios centrales se observan subtriangulares y de mayor tamaño (Fig. 9 E). Hacia el fin del fraccionamiento hay receptáculo libre en el ápice y no se observa flor terminal (Figs. 9 F, H). La progresión de la organogénesis en el capítulo es centripeta (Fig. 10 A-D) y se observan tricomas incipientes en el receptáculo (Fig. 10 A). La progresión de la organogénesis en los primordios florales es corola-androceo-cáliz (C-A-K). Los lóbulos de la corola surgen simultáneamente a partir del anillo (Fig. 10 B, E) y el desarrollo del papus es integral con la

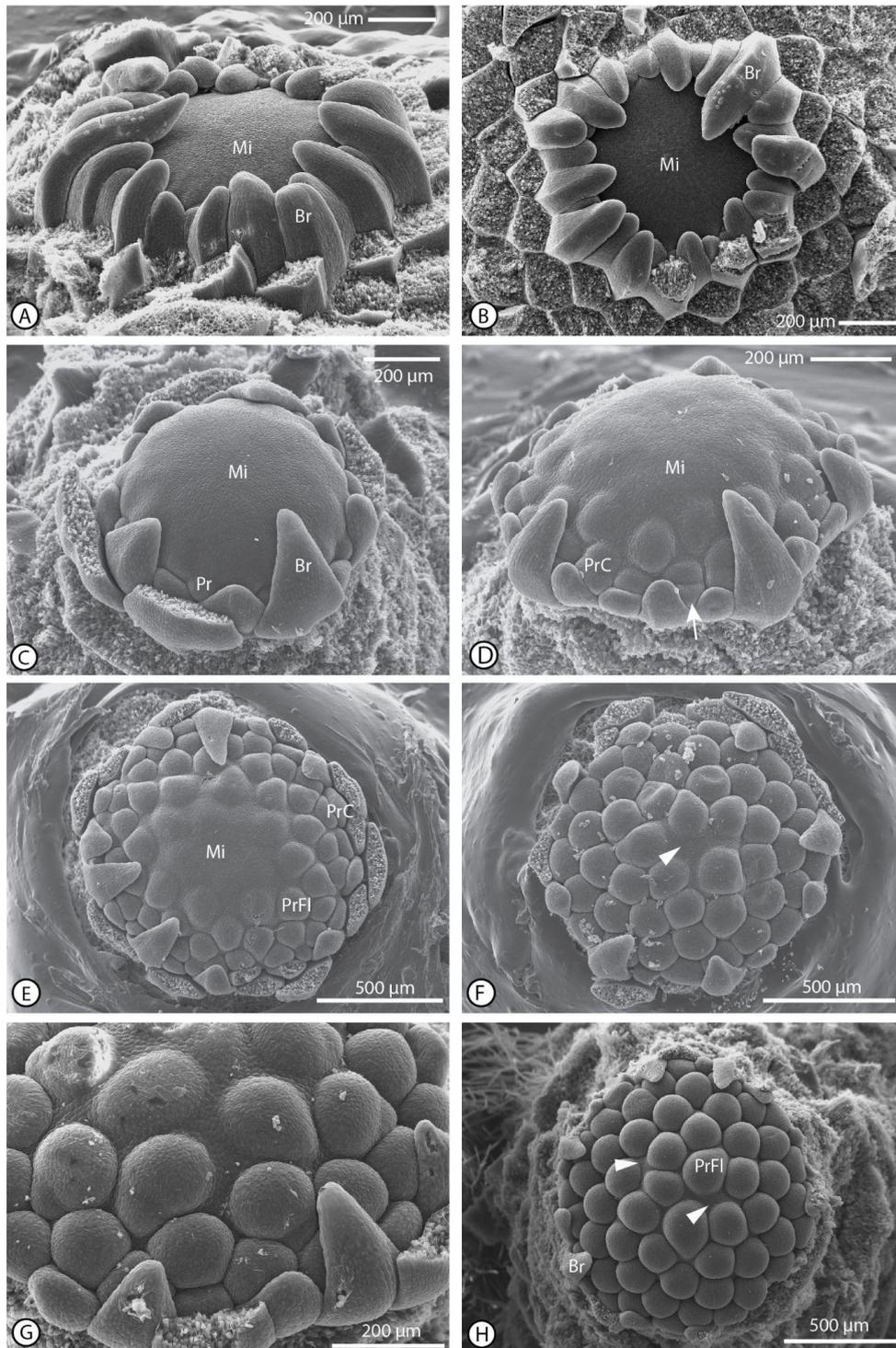


Figura 9 Desarrollo de inflorescencias y flores de *Arnaldoa weberbaueri*. **A-B. Establecimiento del meristema de la inflorescencia.** **A.** meristema plano en vista lateral. Fracción filotáctica aumentada. **B.** Meristema plano en vista polar. **Slechtendalia luzulifolia.** **C-H. Fraccionamiento del meristema de la inflorescencia** **C.** Meristema convexo y primordios marginales incipientes. **D.** Tres series de primordios diferenciadas. Primordios comunes (flecha). **E.** Cinco a seis series de primordios diferenciadas. Algunos primordios de forma triangular. Meristema central indiferenciado. **F-H Fraccionamiento completo.** **F** Receptáculo libre en el ápice (flecha). **G.** Detalle de los primordios florales triangulares y productos de primordio común. **H.** Primordios apicales de mayor tamaño que marginales. Receptáculo apenas libre en el ápice (flecha). **Br:** bráctea. **Mi:** meristema de la inflorescencia. **Pr:** primordio. **PrC:** primordio común. **PrFl:** primordio floral. **RL:** receptáculo libre.

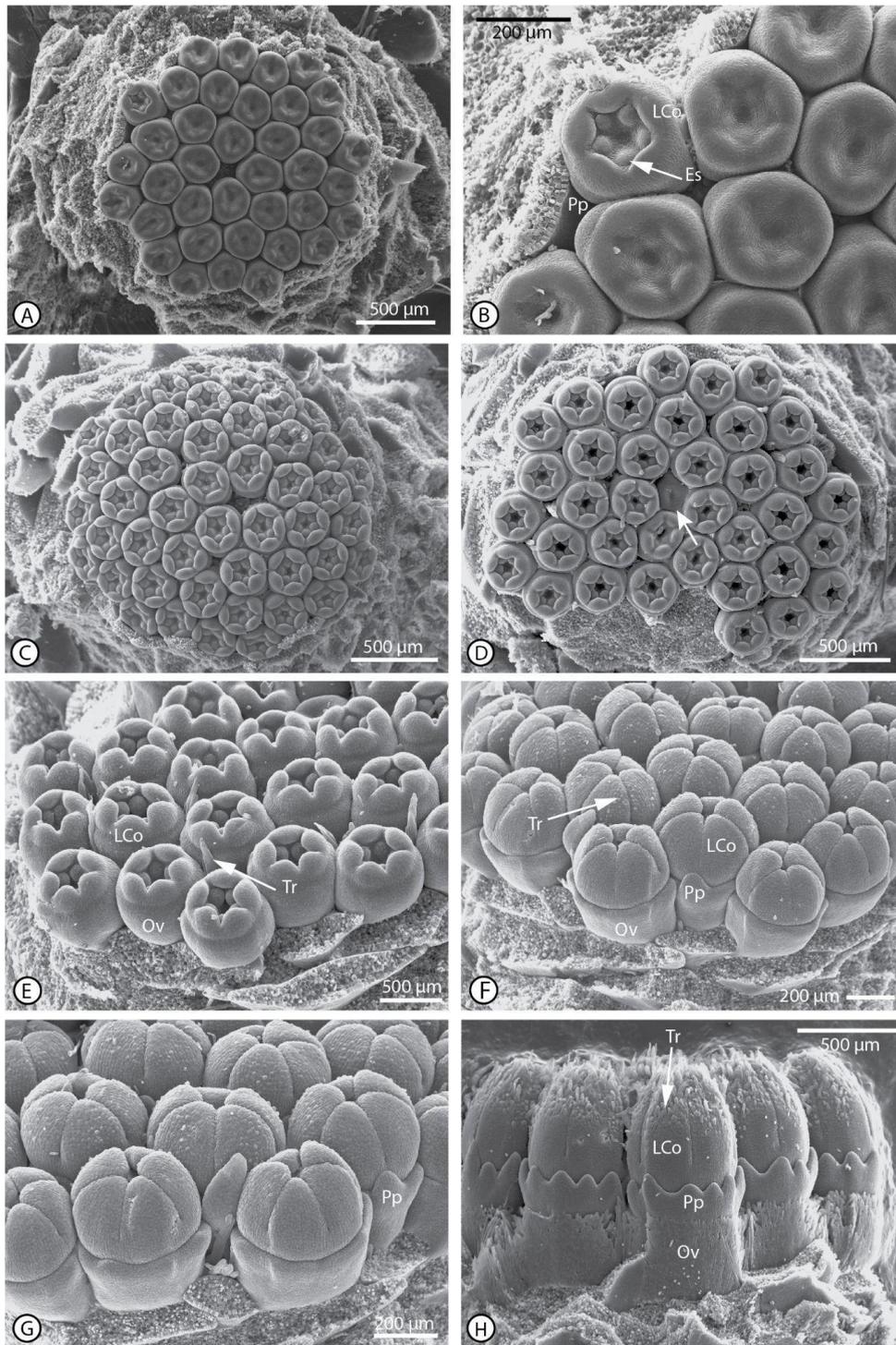


Figura 10 Desarrollo de inflorescencias y flores de *Slechtendalia luzulifolia*. **A-G. Organogénesis.** **A.** Progresión centripeta, primordios en estado de embudo. **B.** Detalle, primordio marginal con estambres incipientes. **C** Corola y estambres en todas las flores. Papus incipiente. **D.** Mayor desarrollo, primordio central atrasado (flecha). **E.** Primordio abierto mostrando el androceo en vista lateral. Constricción primaria. **F-G.** Tricomas y papus mas desarrollados. **H.** Crecimiento zonal: Corola desarrollada y ovario con indumento, papus incipiente (glabro). **Es:** estambres. **LCo:** lóbulos de la corola. **Ov:** ovario. **Pp:** papus. **Tr:** tricomas

organogénesis, pero tardío, mostrando una iniciación secuencial. Al final de la organogénesis el ovario es glabro y hay incipientes tricomas en la corola (Fig. 10 F-G).

Durante el crecimiento zonal los lóbulos de la corola y la pared del ovario se cubren de tricomas y todos las cerdas del papus tienen la misma longitud (Fig 10 H).

4.1.2 Capítulos disciformes y heterógamos

Los capítulos disciformes y heterógamos fueron estudiados en los dos géneros de barnadesioideas que los presentan *Duseniella* (*D. patagonica*) y *Doniophyton* (*D. weddellii*), se caracterizan por presentar pocas flores con corola tubulosa angosta y femeninas en el margen y flores numerosas con corola tubulosa y hermafroditas en el disco.

Género *Duseniella*

Duseniella patagonica tiene el meristema de la inflorescencia convexo (Fig 11 A-B). La progresión del fraccionamiento del meristema es centrípeta (Fig. 11 A-D) y se observan primordios florales de forma hemisférica y primordios comunes con receptáculo libre entre ellos (Fig 11 A-B flecha). Algunos primordios marginales presentan forma triangular o poligonal (Fig. 11 E, flechas). Hacia el fin del fraccionamiento hay receptáculo libre en el ápice y no se observa flor terminal (Fig 11 D-E).

La progresión de la organogénesis en el capítulo es centrípeta y no se observan tricomas sobre el receptáculo (Fig. 11 G-H). La progresión de la organogénesis en los primordios florales es, en las flores del disco, corola-androceo-cáliz(C-A-K) y en las flores del radio, corola/cáliz (C/K). Los lóbulos de la corola surgen simultáneamente a partir del anillo meristemático de la corola y el desarrollo del papus es integral con la organogénesis, pero tardía, y secuencial en ambos tipos de flores. Las flores del radio exhiben un atraso en su desarrollo respecto a las flores del disco desde el comienzo de la organogénesis (Fig. 12 A-H) y no muestran primordios de estambres (Figs. 11 H, 12 A-B, E-G) a excepción de algún estaminoide reducido (Fig. 12 F). Hacia el fin de la organogénesis (Fig. 12 C-G) la mayoría de las flores han cerrado los lóbulos de la corola, y muestran tricomas incipientes en la corola y abundantes en el ovario y las cerdas principales del papus están diferenciadas. Durante el crecimiento zonal, el indumento de la pared del ovario se hace más profuso, los tricomas en los lóbulos de la corola de las flores del disco se alargan y las cerdas del papus crecen y desarrollan tricomas en su margen (Fig 12 H). Respecto a la unisexualidad de las flores del radio de *Duseniella patagonica* la mayoría de las flores no desarrollan primordios de estambres (solo en una flor se encontró un primordio de estambre abortado) (Fig 12 E-G).

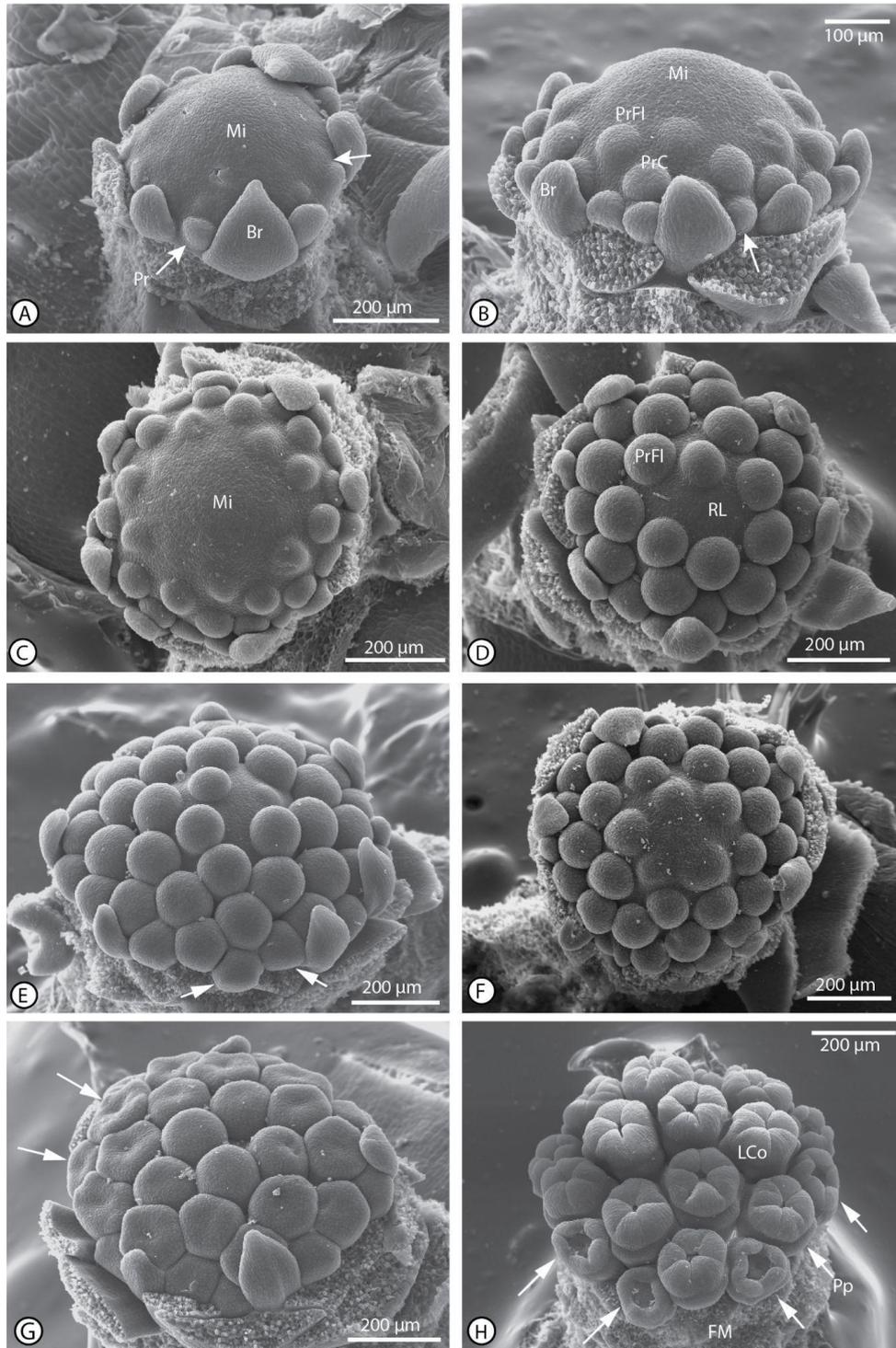


Figura 11. Desarrollo de inflorescencias y flores de *Dusenella patagonica*. A-F. Fraccionamiento del meristema de la inflorescencia. A. Meristema convexo y primera serie de primordios (flecha). **B.** Dos a tres series de primordios diferenciadas. Primordios comunes (flecha). **C.** Vista polar. Receptáculo libre entre primordios. Meristema indiferenciado. **D-F** Fraccionamiento completo. **D.** Receptáculo libre. **E.** Vista lateral. Primordios marginales de forma poligonal. **F.** primordios hemisféricos. **G-H Organogénesis. G.** Comienzo del estadio de embudo: primordios con hundimiento central (flecha). Progresión de la organogénesis centripeta para el capítulo. **H.** Flores del radio atrasadas (flechas). Pappus incipiente. **Br:** bráctea. **Es:** estambres. **LCo:** lóbulos de la corola. **Mi:** meristema de la inflorescencia. **Ov:** ovario. **Pp:** pappus. **Pr:** primordio. **PrC:** primordio común. **PrFl:** primordio floral. **RL:** receptáculo libre.

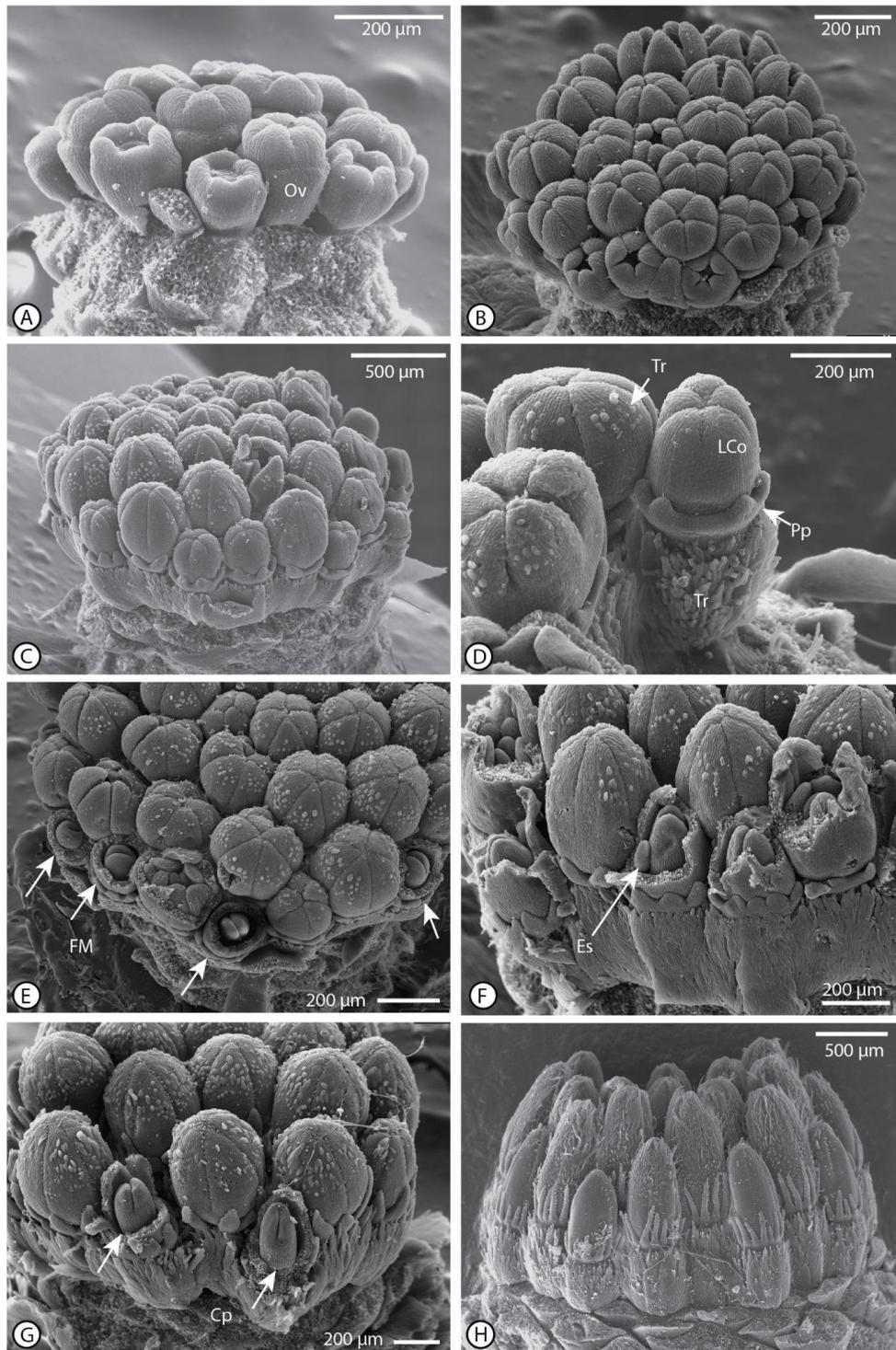


Figura 12. Desarrollo de inflorescencias y flores de *Dusenella patagonica*. A-G. Organogénesis. A. Vista lateral. Flores del radio más pequeñas y atrasadas. Ovario glabro. **B.** Corolas cerrándose. **C-G.** Fin de la organogénesis. Ovario con indumento abundante. Tricomas de la corola incipientes. **D.** Flor del radio. **E-G.** Flores del radio con corola removida (flechas). **F.** Estaminoide abortado (flecha). **G.** Carpelos (flechas). **H. Crecimiento zonal.** Todos los órganos y tricomas elongados. **Cp:** carpelos. **Es:** estambres. **FM:** flor marginal. **LCo:** lóbulos de la corola. **Ov:** ovario. **Pp:** papus. **Tr:** tricomas

Género *Doniophyton*

En el caso del género *Doniophyton*, se observaron estados avanzados del desarrollo, donde durante el crecimiento zonal de *Doniophyton weddellii* (Fig. 13 A) las flores del radio presentan los estambres (Fig 13 B-D) e incluso llegan a tener tejido esporógeno (Fig 13 E).

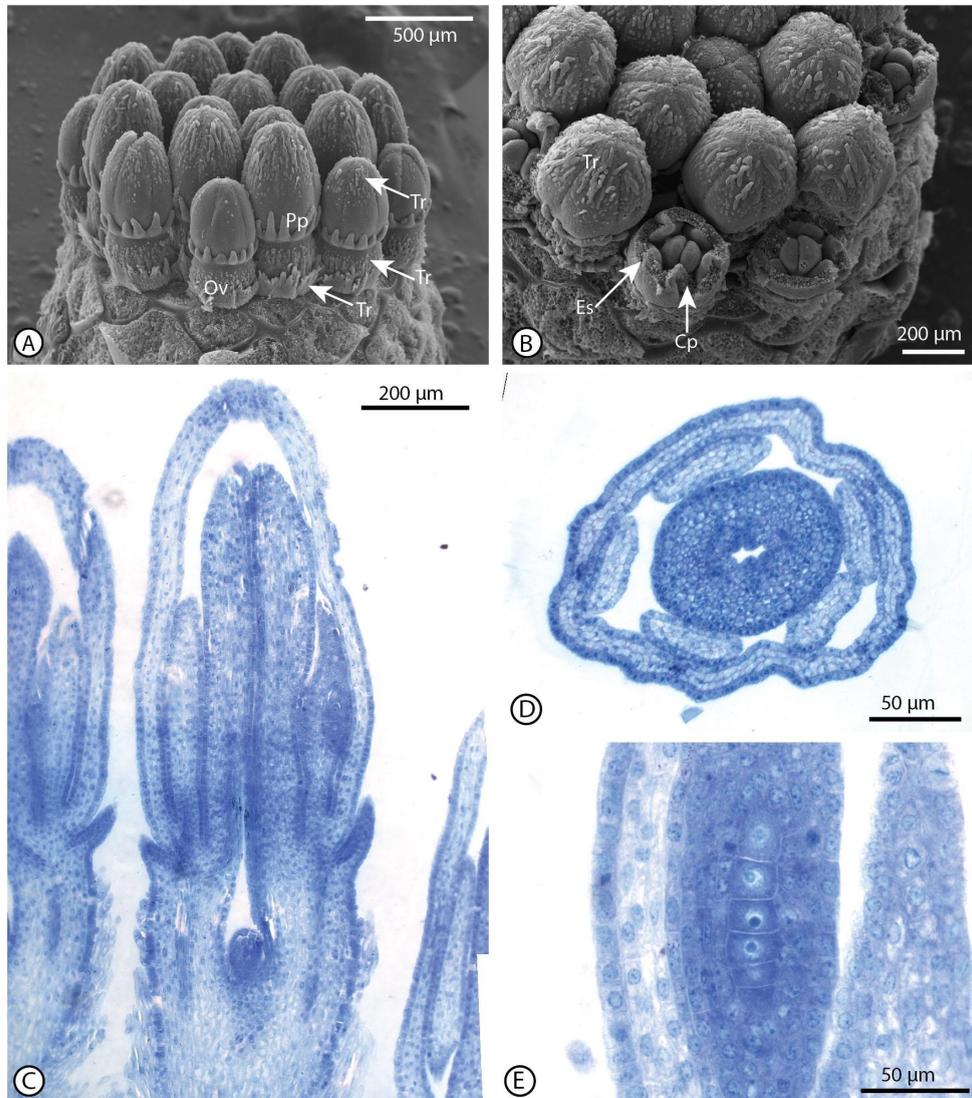


Figura 13. Desarrollo de inflorescencias y flores de *Doniophyton weddellii*. A-E. Crecimiento Zonal. A. Flores del radio atrasadas, papus e indumentos desarrollados. **B.** Flores del radio con corolas removidas. **C.** Corte longitudinal de flor del margen. Estambres desarrollados. **D.** Corte transversal de flor del margen: corola, estambres y estilo **E.** Primordio estaminal de flor del margen con tejido esporógeno. **Cp:** carpelos. **Es:** estambres. **LCo:** lóbulos de la corola. **Ov:** ovario. **Pp:** papus. **Tr:** tricomas.

4.1.3 Capítulos radiados y homógamos

Los capítulos radiados tienen flores comúnmente homógamas y hermafroditas, las corolas de las flores del radio son subbilabiada 4+1 y las del disco son variadas (subbilabiada, subligulada, ligulada o tubulosa). Este capítulo fue estudiado en *Barnadesia* (*B. odorata* y *B. aculeata*) y *Huarpea andina*.

Género *Barnadesia*

En *Barnadesia odorata* el meristema de la inflorescencia es plano (Fig 14 A-B), tempranamente queda delimitado por un anillo a partir del cual se observan dos zonas, una central y la otra marginal (Fig 14 C-D) que se corresponden con los meristemas que diferenciarán las flores del margen y las flores del disco. La progresión del fraccionamiento del meristema es simultánea (Fig 14 D) y hacia su final los primordios florales aumentan de tamaño hasta llegar al estado de tapón o *plug*, siendo los primordios del disco de mayor tamaño y entre estos queda receptáculo libre (Fig 14 E). La progresión de la organogénesis en el capítulo es centrífuga debido al retraso del desarrollo de los primordios florales del radio. Para este estadio, el receptáculo se encuentra cubierto de tricomas (Fig 14 F). La progresión de la organogénesis de los primordios florales en las flores del disco es corola, cáliz, androceo (C-K-A) mientras que en las del radio es corola, androceo, cáliz (C-A-K). Los lóbulos de la corola surgen simultáneamente a partir del anillo meristemático de la corola y el desarrollo del papus, en las flores del disco, es integral con la organogénesis, aunque tardío y secuencial (Fig. 14 G-H). El atraso del desarrollo de las flores del radio, evidenciado sobre todo por el papus, no permite concluir si éste es o no integral a la organogénesis en estas flores. Las flores del radio con la corola cigomorfa pseudobilabiada (4+1) diferenciada, poseen una orientación de la corola respecto del eje del capítulo opuesta a las flores del disco, con un lóbulo lineal en posición adaxial o interno (Figs. 14 H, 15 A, B). Hacia el fin de la organogénesis, el papus aún no está totalmente delimitado en las flores del radio, sus corolas y ovarios son glabros mientras que el receptáculo es piloso (Fig. 15 C). Durante el crecimiento zonal los tricomas de la corola y cerdas del papus se elongan (Fig 15 D, E). Mientras que las flores marginales tienen las cerdas del papus de distinta longitud lo que indica que su desarrollo es secuencial (Fig 15 F).

En *Barnadesia aculeata* al final de la organogénesis ya está diferenciada la corola pseudobilabiada (4+1) y los papus también, en las flores del radio las cerdas son de distintas longitudes y en la flor del disco las cerdas son iguales (Fig. 15 G). El desarrollo del papus es integral con la organogénesis y secuencial. Las corolas tienen tricomas incipientes y los ovarios son glabros (Fig. 15 H).

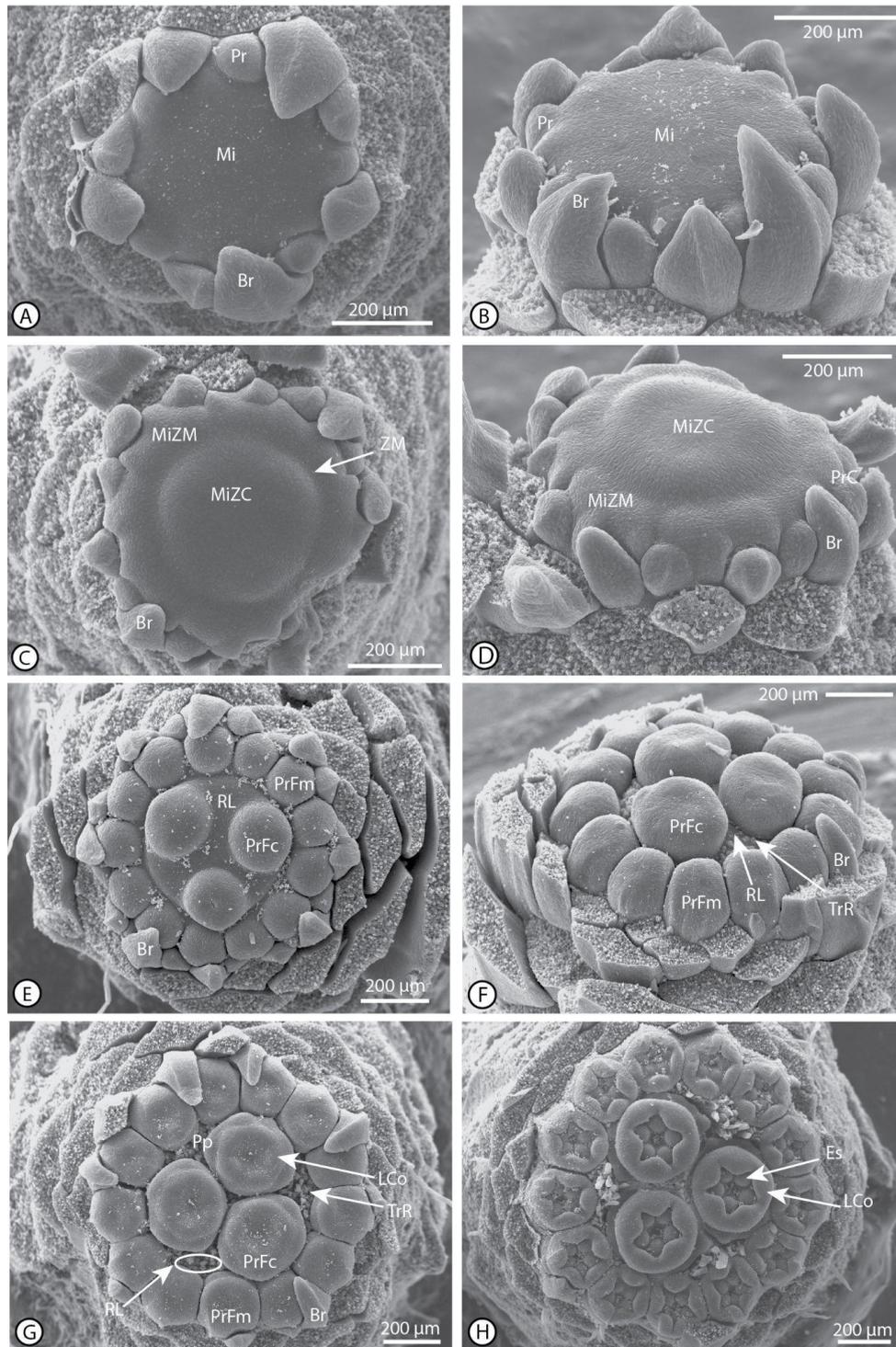


Figura 14. Desarrollo de inflorescencias y flores de *Barnadesia odorata*. A-E. Fraccionamiento del meristema. A-B. Progresión centrífuga del fraccionamiento, meristema de la inflorescencia plano, brácteas y primera serie de primordios en formación. **C-D.** Zonación meristemática. zonas marginal y central, primordios comunes. **C:** Vista polar. **D.** Vista lateral. **E.** Fin del fraccionamiento. Receptáculo libre en zona del disco. **F-H. Organogénesis. F.** Progresión centrífuga de la organogénesis del capítulo: primordios de las flores del disco en estado de embudo. **G.** Primordios del disco con lóbulos de la corola diferenciados. **H.** Primordios de las flores del disco más avanzada que las flores del radio. **Br:** bráctea. **Mi:** meristema de la inflorescencia. **MiZC:** meristema de la zona central. **MiZM:** meristema de la zona marginal. **Pr:** primordio. **PrC:** primordio común. **PrFc:** primordio flor central. **PrFm:** primordio flor marginal. **RL:** receptáculo. **Tr:** tricomas.

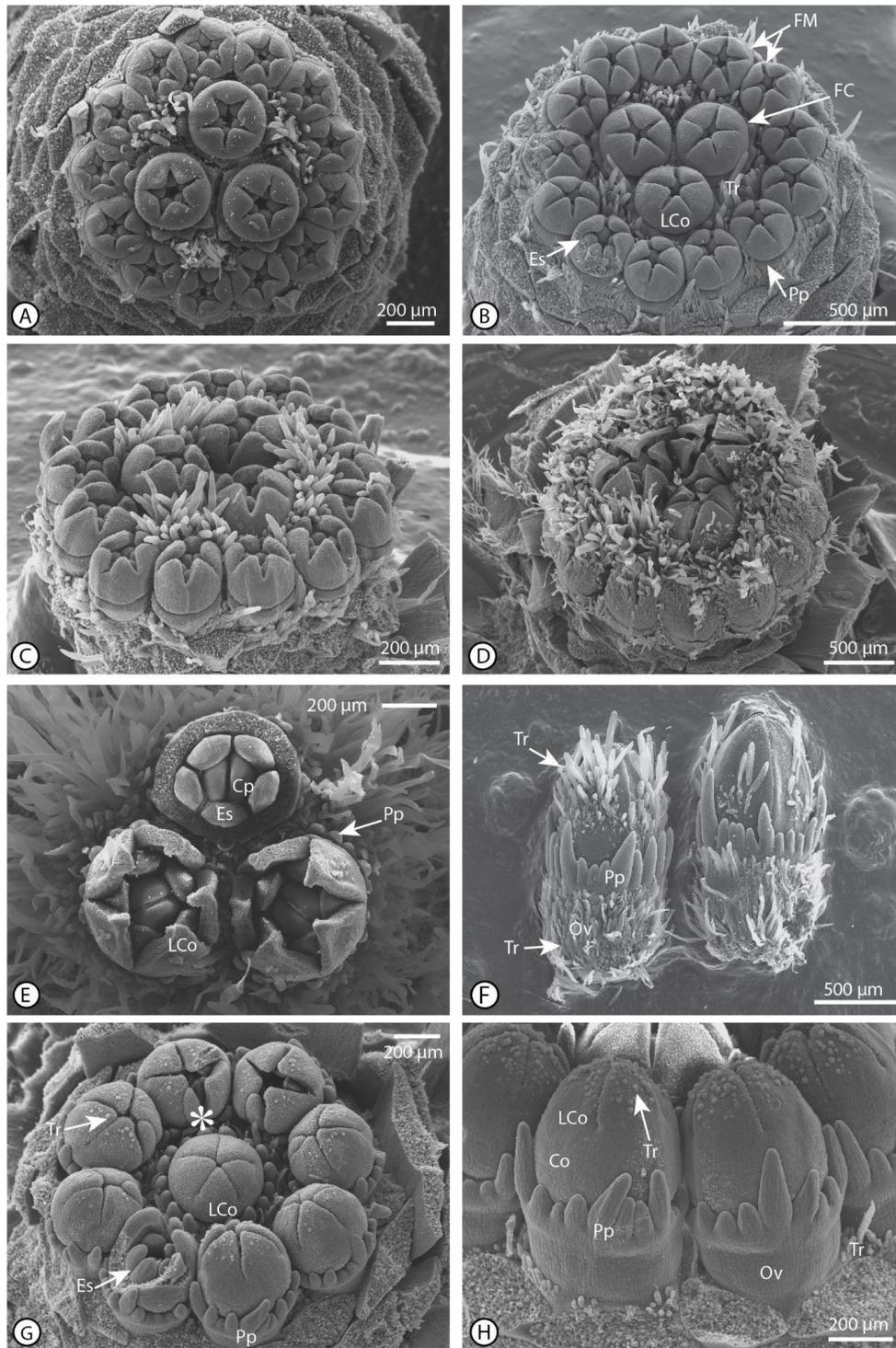


Figura 15 Desarrollo de inflorescencias y flores de *Barnadesia odorata*. A-C. Organogénesis. A. Flores del disco con papus avanzado y flores del radio atrasadas. **B.** Flores del disco con papus poco diferenciado. **C.** Organogénesis avanzada. Receptáculo piloso, papus de las flores del radio con cerdas incipientes. **D-F. Crecimiento zonal. D.** Receptáculo piloso y corolas de flores del radio con más tricomas que de flores del disco. **E.** Detalle de flor central (con corola removida): estambres (5) y carpelos (2) Receptáculo piloso. **F.** Dos flores del radio: crecimiento asimétrico del papus y tricomas abundantes en corola y ovario. **G-H. *Barnadesia aculeata*. Organogénesis. G.** Tricomas de la corola incipientes. Flores del radio subbilabiadas (4+1). **H.** Dos flores del radio: ovario glabro, papus con cerdas de distinta longitud, lobulos de la corola cerrados con tricomas incipientes. **Cp:** carpelos. **Es:** estambres. **FM:** flor marginal. **FC:** flor central. **LCo:** lóbulos de la corola. **Ov:** ovario. **Pp:** papus. **Tr:** tricomas.

Género *Huarpea*

Para *Huarpea andina* se observaron estados avanzados de la organogénesis, donde las flores del radio desarrollan óvulos (Fig 16 A) y estambres funcionales (Fig 16 D) mientras que la única flor central está atrofiada (Fig 16 A-D).

Se observó que la flor central tiene estambres y carpelos presentes (Fig 17 A) pero en los cortes histológicos realizados no se vió tejido esporógeno en las anteras ni óvulo en el ovario (Fig 16 C). Ambos tipos de flores también se distinguen por la morfología del estilo: mientras que las flores del margen tienen un estilo cortamente bifurcado de ramas estilares redondeadas achatadas y expandidas y cada una con una protuberancia en su base (Fig 17 B-C), la flor del centro posee un estilo prominente con superficie estigmática papilosa, pero no tiene las ramas estilares achatadas y expandidas sino que son anchas y macizas y carece del característico bulto o protuberancia alargada en su base (Fig 17 A).

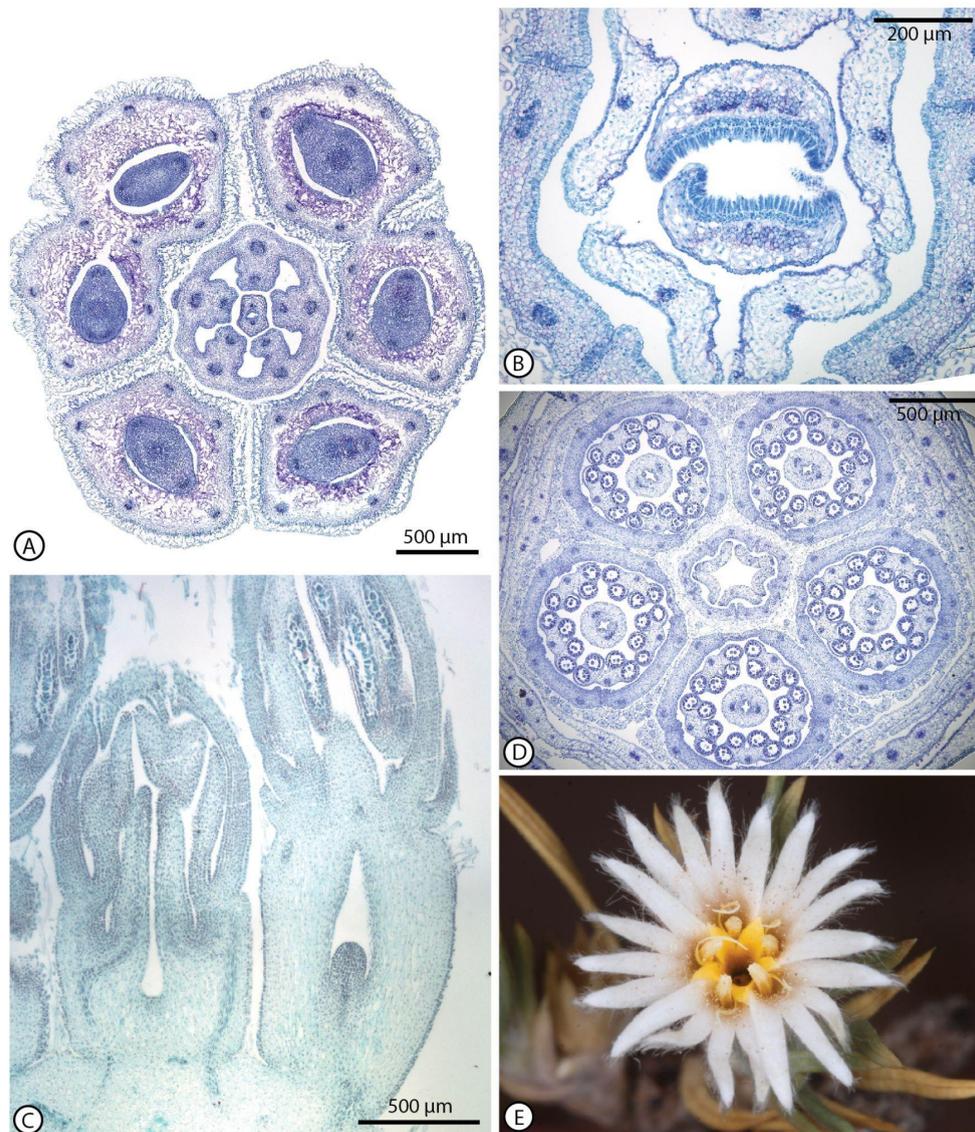


Figura 16. Desarrollo de inflorescencias y flores de *Huarpea andina*. **A.** Corte transversal de capítulo. Óvulos de las flores del radio desarrollados. Flor central más corta, filamentos de los estambres desprendiéndose de la corola. Haces vasculares independientes. **B.** Corte transversal de flor del centro a nivel del estilo. Superficie estigmática bien desarrollada. Anteras atrofiadas. **C.** Corte longitudinal de capítulo. Flor del centro estéril. Flor del margen con rudimento seminal y anteras con tejido esporógeno. **D.** Corte transversal de capítulo. Flores del radio con tejido esporógeno. Flor del centro con anteras atrofiadas. **E.** Capítulo en antesis. Flor central con corola tubulosa.

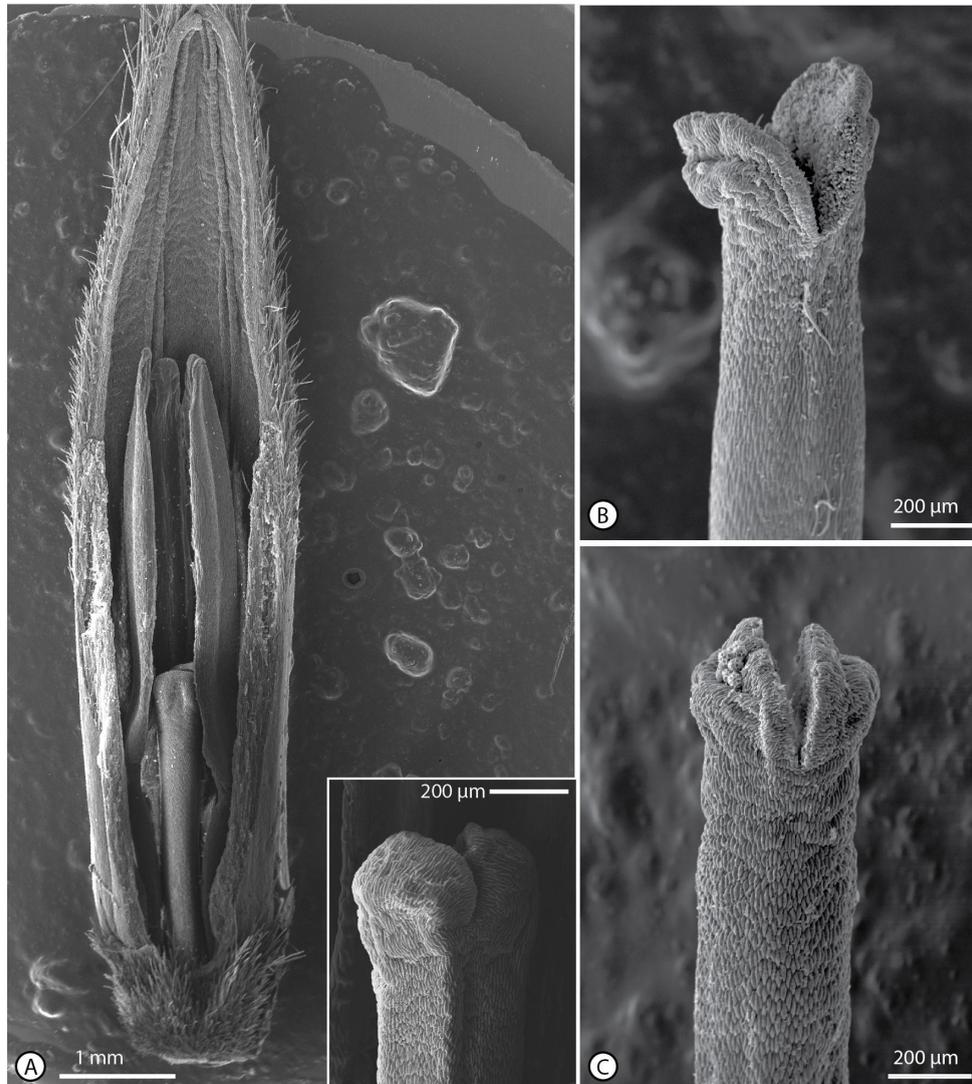


Figura 17. Desarrollo de flores y estilos de *Huarpea andina*. **A.** Flor del centro. ovario atrofiado. Pappus ausente. Estilo atrofiado.. Recuadro: detalle de estilo de flor central. **B.** Estilo de flor marginal **C.** Vista lateral de estilo de flor marginal con algunos granos de polen adheridos.

4.2. Esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis

4.2.1 Esporangiogénesis

La esporangiogénesis fue estudiada en *Chuquiraga avellanadae*, *C. ruscifolia*, *Dasyphyllum brasiliense*, *Duseniella patagonica* y *Schlechtendalia luzulifolia*.

En cada uno de los vértices del primordio tetralobulado de la antera (microsporangio), se observaron cuatro grupos de células iniciales subepidérmicas de seis o siete células de extensión (Fig. 18) en *Chuquiraga avellanadae* (Fig. 28 A), *C. ruscifolia* (Fig. 28 B-C), *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 29 A) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 39 A-B). Estas células iniciales se diferencian de las circundantes por su posición subepidérmicas, su ordenamiento en una única capa, a veces por el mayor tamaño celular o de sus núcleos, y las divisiones periclinales asincrónicas.

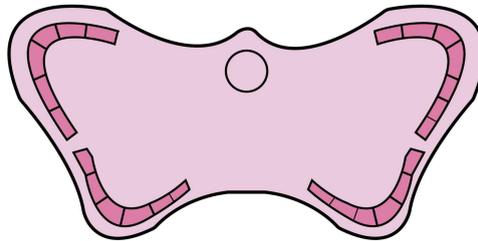


Figura 18: Esquema simplificado de la esporangiogénesis temprana. Células iniciales subepidérmicas (rosa oscuro) en el microsporangio en formación.

Las células iniciales subepidérmicas sufren divisiones periclinales segregando primero las arquésporas, que en algunos casos observados experimentan mitosis muy tempranamente como en *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 39 B), y que se caracterizan por expresar un desarrollo celular premeiótico (DCP) temprano incluso antes de la segregación final de las cuatro capas del microsporangio como se observó en *Chuquiraga avellanadae* (Fig. 28 A), *C. ruscifolia* (Fig. 28 C) y *Duseniella patagonica* (Fig. 34 A).

Las siguientes divisiones periclinales de las células iniciales subepidérmicas originan el tapete, la capa media y el endotecio, respectivamente. La pared de la antera queda constituida entonces por cuatro capas: epidérmica, subepidérmica (futuro endotecio), intermedia, y profunda (futuro tapete), observados en *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 29 B-C), *Duseniella patagonica* (Fig. 34 A) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Figs. 39 C, 40 A-C). Durante este estadio, cuando la pared de la antera tiene las cuatro capas, pudo observarse que el gradiente de DCP se extiende a algunas células del tapete como en *Schlechtendalia luzulifolia* (Figs. 39 C, 40 A).

4.2.2 Microsporogénesis

Se observó en *Barnadesia odorata*, *Chuquiraga ruscifolia*, *C. erinacea*, *Dasyphyllum brasiliense*, *Doniophyton weddellii*, *Duseniella patagonica*, *Huarpea andina* y *Schlechtendalia luzulifolia*.

Las arquésporas experimentan mitosis y se organizan en dos o tres filas de tejido arquesporial en *Chuquiraga erinacea* (Fig. 25 E), *C. ruscifolia* (Fig. 28 D), *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 29 C) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 40 D-E). Cuando entran en profase I se diferencian en células madre de las microsporas caracterizadas por su forma redondeada y por tener una envoltura de calosa identificadas en *Barnadesia odorata* (Figs. 22 A, 23 A), *Duseniella patagonica* (Figs. 34 B-C, 35 A-C), *Huarpea andina*, (Figs. 37 A) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Figs. 39 D, 40 F-G). Las células del tapete han aumentado de tamaño y ocupan gran parte del lóculo, sus células son prismáticas (en sección transversal) con citoplasma denso y núcleos muy grandes, y ocasionalmente se muestran binucleadas como en *Duseniella patagonica* (Fig. 34 C), *Huarpea andina* (Fig. 37 A), *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 40 F) o con núcleos en anafase en *Barnadesia odorata*, (Fig. 22 A), lo que indica que hay divisiones anticlinales intervienen en el crecimiento en diámetro de la antera. Ocasionalmente, el gradiente de DCP puede extenderse a las células, que por su posición y origen forman parte del tapete, y transforman en células madre de las microsporas como en *Duseniella patagonica* (Fig. 35 C). En el microesporangio se observa una reducción en la capa media mientras que el endotecio y la epidermis se mantienen sin cambios.

Una vez diferenciadas las células madre, las microsporas experimentan meiosis y citocinesis simultánea, y las cuatro células haploides resultantes o microsporas forman una tétrade tetraédrica permaneciendo envueltas en calosa como en *Chuquiraga ruscifolia* (Fig. 28 E), *Doniophyton weddellii* (Fig. 32 A), *Huarpea andina* (Fig. 37 B) hasta que se forma la primexina observada en *C. ruscifolia* (Fig. 28 F) y *Huarpea andina* con la primexina lofada (Fig. 37 C-D). Posteriormente, durante la segregación de las microsporas, éstas se liberan de la envoltura de calosa y se caracterizan por poseer un gran núcleo central, abundante citoplasma y la primexina (polisacáridica y proteica) interrumpida donde luego se hallarán las aberturas del grano de polen, ilustrado para *Barnadesia odorata* (Fig. 23 B) y *Schlechtendalia luzulifolia*, (Fig. 40 H).

También, durante la formación de tétradas y la segregación de microsporas comienza el desarrollo de la endexina. Ésta capa tiene mayormente composición esporopolenínica y ocasionalmente polisacáridos como en *Dasyphyllum brasiliense*, (Fig. 29 D), *Doniophyton weddellii* (Fig. 33 D) y *Duseniella patagonica* (Figs. 34 D, 35 D) o polisacáridos y proteínas como lo observado en *Barnadesia odorata* (Fig. 23 C), *Huarpea andina* (Fig. 37 F) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Figs. 39 E, 40 H, 41 A-B).

Antes de la vacuolización de la microspora, en este estadio de “microspora libre temprana”, el depósito de la ectexina puede avanzar considerablemente hasta alcanzar un grosor significativo como en *Barnadesia odorata* que llega hasta ca.10 μm de altura (Figs. 22 B, 23 D), *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 29 D-E), *Doniophyton weddellii* (Fig. 32 B) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Figs. 39 F, 41 A-B). En esta etapa, la capa media aún persiste, el tapete está en plena actividad con algunas de sus células binucleadas y el endotecio está levemente diferenciado, con sus células adquiriendo forma prismática.

4.2.3 Microgametogénesis

La microgametogénesis involucra varias etapas (Fig. 19) y fue estudiada en *Barnadesia odorata*, *Chuquiraga aurea*, *C. jussieui*, *C. parviflora*, *C. ruscifolia*, *C. erinacea*, *Dasyphyllum brasiliense*, *Doniophyton anomalum*, *D. weddellii*, *Duseniella patagonica*, *Huarpea andina* y *Schlechtendalia luzulifolia*.

La microspora desarrolla una gran vacuola que desplaza al núcleo hacia la periferia originando la polaridad celular como en *Barnadesia odorata* (Fig. 23 E), *Chuquiraga ruscifolia* (Fig. 28 G), *Doniophyton weddellii* (Figs. 32 F) y *Duseniella patagonica* (Fig 35 E). El tapete, tras haber alcanzado su punto cúlmine de desarrollo, comienza a declinar su actividad como en *Chuquiraga erinacea* (Fig. 26 F-G), desorganizarse invadiendo los lóculos, en los tapetes periplasmiales, como *Dasyphyllum brasiliense* (Figs. 29 E-H, 30 A) y *Huarpea andina* (Figs. 37 E, G-H, 38 B) o degradándose, en los tapetes secretores, como en *B. odorata* (Fig. 23 H). Luego de la vacuolización sucede la primera mitosis que resulta en dos células desiguales: la célula sifonogénica, de mayor tamaño que retiene la vacuola y la célula gametogénica de menor tamaño, lenticular que se adosa a la pared como se observa en *Barnadesia odorata* (Fig. 23 F) y que luego será englobada por la célula sifonogénica. La vacuola de la célula sifonogénica empieza a reducirse o disgregarse en vacuolas menores hasta desaparecer completamente durante el englobamiento.

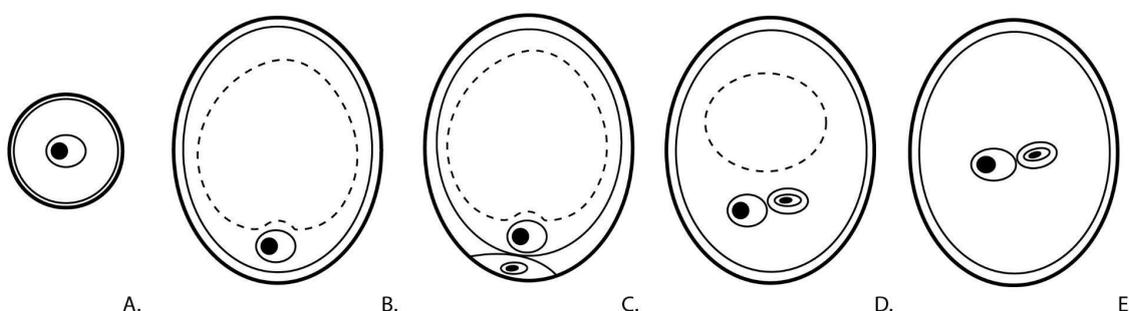


Figura 19. Esquema simplificado de la microspora y grano de polen durante la microsporogénesis y microgametogénesis. A. Microspora libre. B. Microspora vacuolada. C. Grano de polen bicelular con célula gametogénica (lenticular, adosada a la pared) y sifonogénica

(conservando la vacuola) resultantes de la primer mitosis. **D.** Englobamiento de la célula gametogénica y reducción de la vacuola. **E.** Grano de polen bicelular con vacuola completamente consumida.

Seguidamente, comienza la etapa de acumulación de sustancias de reserva del grano de polen donde el citoplasma de la célula sifonogénica comienza a llenarse de sustancias reservantes como se ilustra para *Duseniella patagonica* (Fig. 36 A-B).

Con respecto a la esporodermis durante la microgametogénesis se formará la intina que está engrosada en las zonas de las aberturas y forma parte de un patrón trilaminar en los colporos que consta de la intina, endexina engrosada y sustancias pécticas como se ilustra en *Chuquiraga aurea* (Fig. 25 D), *C. jussieui* (Fig. 26 A-B, D-E), *C. parviflora* (Fig. 27 E, G-H), *Doniophyton anomalum* (Fig. 31 A-B), *D. weddellii* (Fig. 32 D-E), *Duseniella patagonica* (Fig. 36 C) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 41 C).

La composición de la endexina se mostró variable presentando, además de esporopolenina, polisacáridos en *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 30 D, F), *Doniophyton weddellii* (Fig. 33 A-B, D, G) y *Duseniella patagonica* (Fig. 36 C, E, G) o proteínas como en *D. anomalum* (Fig. 31 E) o ambos como en *Barnadesia odorata* (Fig. 24 D, F), *Huarpea andina* (Fig. 38 A, D, F) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 41 F-G).

La endexina puede también estar únicamente compuesta de esporopolenina como en *Chuquiraga jussieui* (Fig. 26 G-H).

Según el funcionamiento del tapete, se observaron dos tipos de tapetes en las barnadesioideas analizadas: (1) secretor, donde el tapete mantiene su estructura celular y se observan cuerpos de Ubisch en el lóculo en *Barnadesia odorata* (Figs. 22 C, 24 B), *Duseniella patagonica* (Fig. 35 F) y (2) periplasmodial, donde las células han invadido el interior del lóculo entre las microsporas en *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 29 H asterisco), *Doniophyton weddellii* (Fig. 32 C-F), *Huarpea andina* (Figs. 37 E, G-H, 38 B). En *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 41 A-B) se observan ambos tipos de tapete. De acuerdo con los análisis de composición, se comprobó que el tapete posee vesículas con precursores de esporopolenina en *Barnadesia odorata* (Fig. 23 G) y *Duseniella patagonica* (Fig. 35 G).

Finalmente, la antera sufre dehiscencia y los granos de polen maduros se liberan y dispersan ya sea en estado bicelular en *Barnadesia odorata* (Figs. 22 D, 24 E), *Chuquiraga ruscifolia* (Fig. 28 H) *Doniophyton weddellii* (Fig. 33 A) o en estado tricelular en *Chuquiraga jussieu* (Fig. 26 C, E), *Duseniella patagonica* (Figs. 34 F, 36 F) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Figs. 39 G-H, 41 D). En otras barnadesioideas con polen tricelular las células espermáticas (gametas masculinas) tienden a adoptar una forma de huso o filiforme (*tailed sperm cell*) como se ilustra para *Dasyphyllum brasiliense* (Figs. 30 B-D, F) y *Huarpea andina* (Fig. 38 E, G-H).

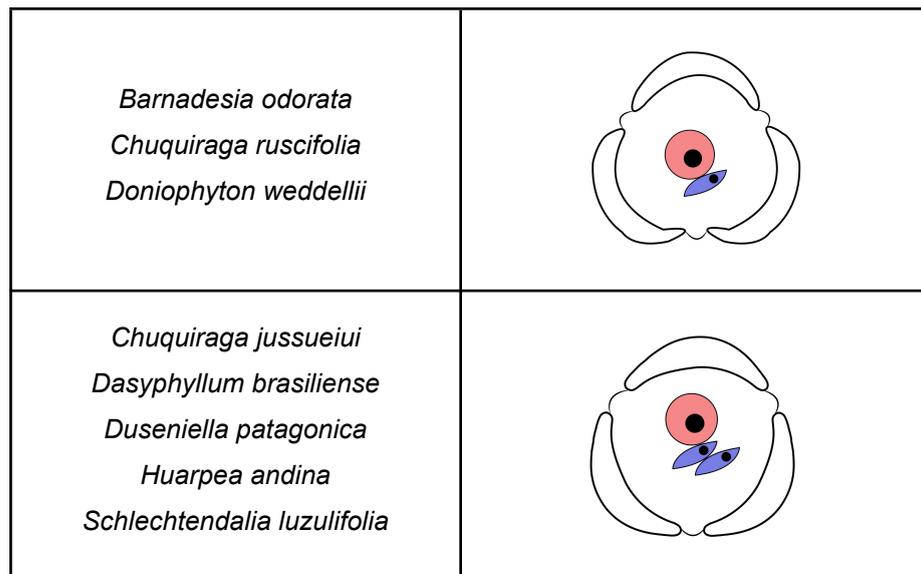


Figura 20. Esquema simplificado de los resultados obtenidos a partir de observaciones con microscopía de campo claro de granos de polen bajo distintos métodos histoquímicos. Célula sifonogámica en rosado y gametogénicas en celeste

Con respecto a las sustancias de reserva del grano de polen se encontró que los granos de polen poseen glúcidos solubles en el citoplasma evidenciados por la tonalidad rosada uniforme para la prueba de PAS en *Barnadesia odorata* (Fig. 24 C-D), *Chuquiraga aurea* (Fig. 25 C), *C. jussieui* (Fig. 26 F-G), *C. parviflora* (Fig. 27 B, D), *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 30 D), *Doniophyton anomalum* (Fig. 31 C-D), *D. weddellii* (Fig. 33 C-D), *Duseniella patagonica* (Fig. 36 A-E), *Huarpea andina* (Fig. 38 C-D) y *Schlechtendalia luzulifolia*, (Fig. 41 E-F).

De acuerdo a la presencia o ausencia de reservas de granos de almidón durante la dehiscencia, se observaron dos tipos de granos de polen: (1) *starchy* con granos de almidón escasos en *Chuquiraga aurea* (Fig. 25 C), *C. parviflora* (Fig. 25 B, D) y *Duseniella patagonica* (Figs. 35 H, 36 D-E), con granos de almidón abundantes en *Chuquiraga jussieu* (Fig. 26 F-G) y *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 30 D), o abundantes muy desarrollados formando "Cruz de Malta" en *Doniophyton weddellii* (Fig. 33 C-E) y (2) *starchless*, sin presencia de granos de almidón como en *Barnadesia odorata* (Fig. 24 C-D), *Doniophyton anomalum* (Fig. 31 C-D), *Huarpea andina* (Fig. 38 C-D) y *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 41 E-F).

Para las reservas lipídicas, se llevó a cabo la prueba de rojo neutro cuyos resultados fueron ambiguos y no concluyentes. En la mayoría de las especies se encontraron vesículas en el citoplasma que es probable que hayan sido reservas lipídicas y que los procesos de fijación

hayan degradado como en *Chuquiraga aurea* (Fig. 25 B), *C. parviflora* (Fig. 27 C, F), *Doniophyton weddellii* (Fig. 33 F).

La estructura de la esporodermis se corrobora como ectexina bicapa en *Chuquiraga aurea* (Fig. 28 D), *C. parviflora* (Fig. 27 G-H), *Doniophyton anomalum* (Fig. 31 F), *D. weddellii* (Fig. 33 H), con cáveas en *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 30 E) y tricapa en *Shlechtendalia luzulifolia* (Fig. 41 H).

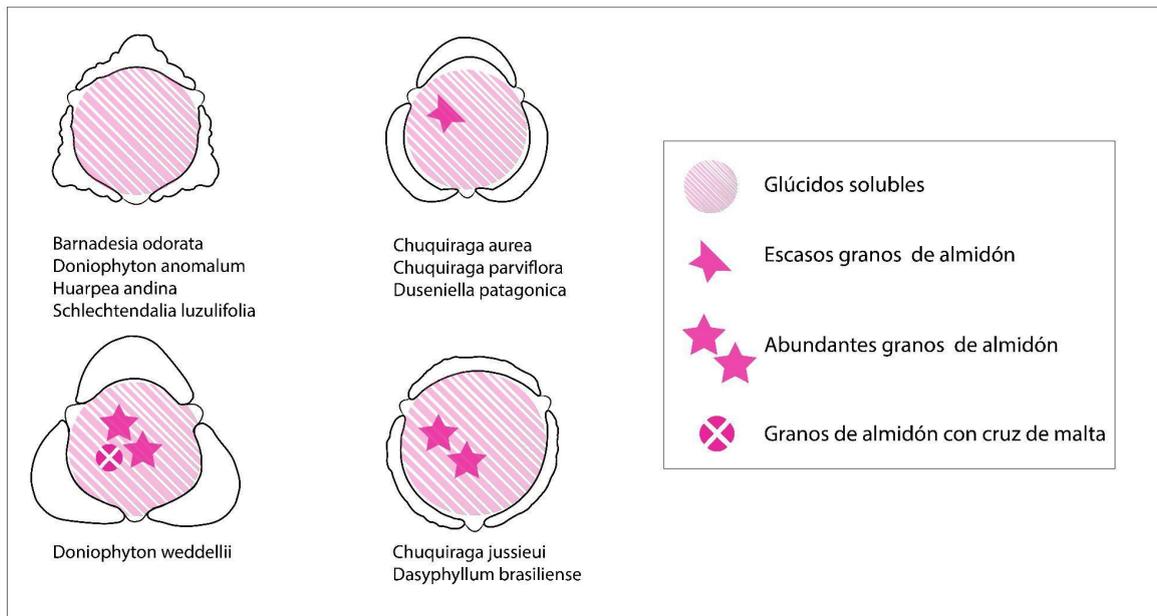


Figura 21. Esquema simplificado de los resultados obtenidos a partir de los ensayos histoquímicos para identificar reservas de los granos de polen.

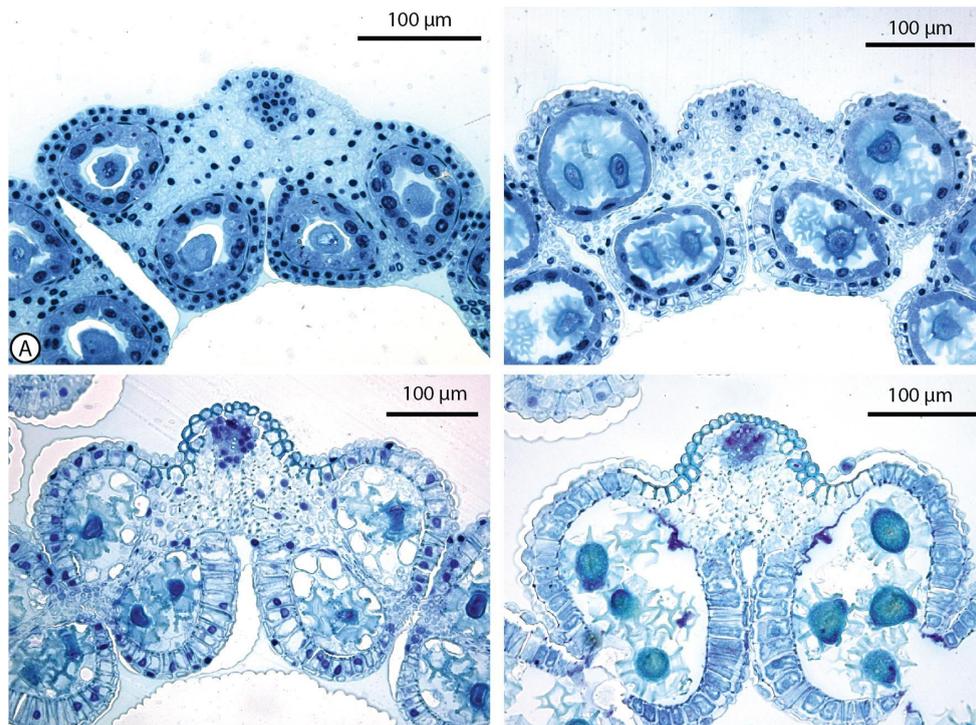


Figura 22. Microsporogénesis y microgametogénesis de *Barnadesia odorata*. A. Microsporogénesis. Pared de la antera de cuatro capas, CMM envueltas en calosa, tapete con células binucleadas. **B-D. Microgametogénesis.** B. Microsporas no vacuoladas con tapete polarizado y endotecio de células primáticas. C. Granos de polen deshidratados con exina desarrollada, cuerpos de Ubisch adheridos y restos del tapete degradado. D. Antesis: antera abierta expulsando los granos de polen con exina lofada.

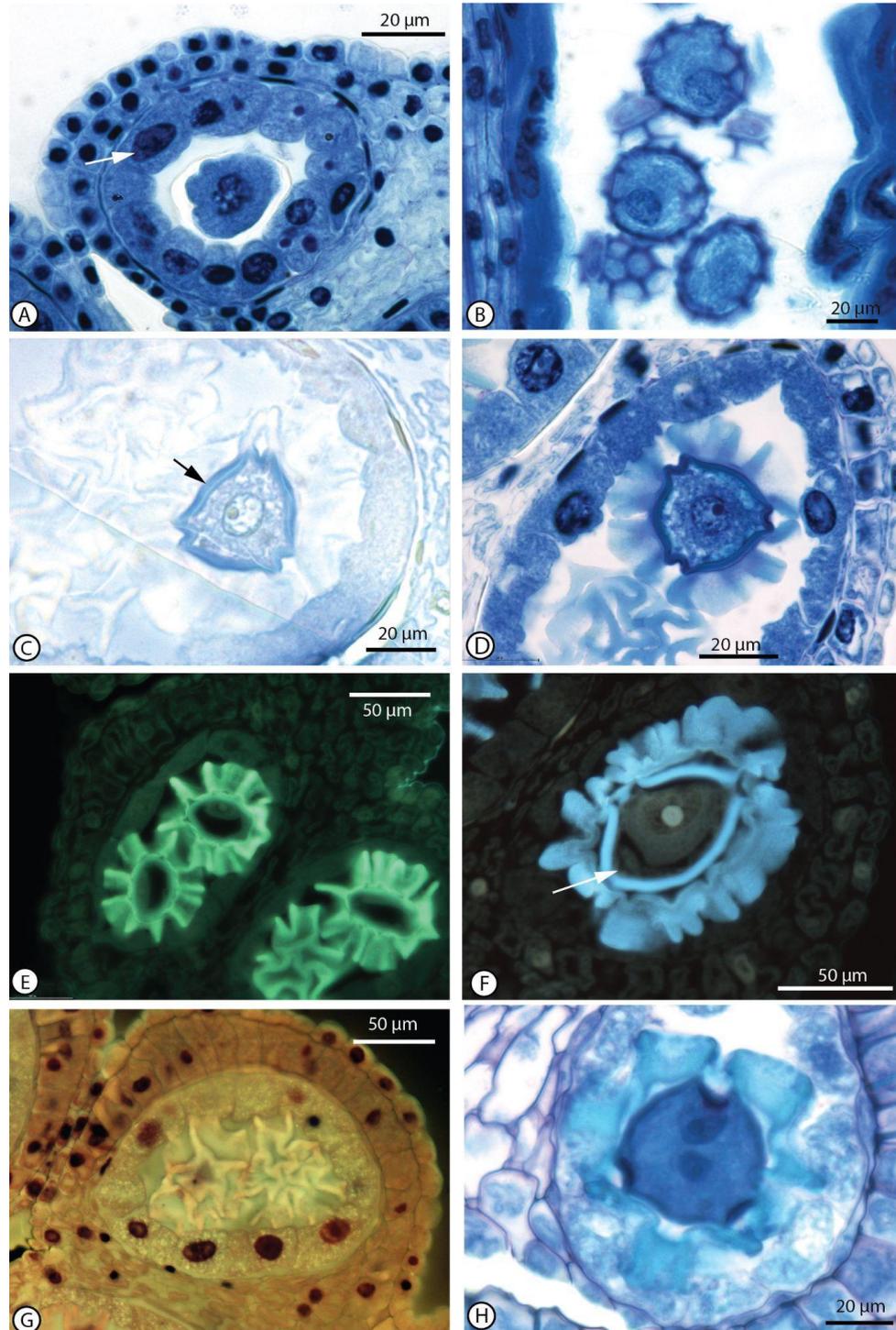


Figura 23. Microsporogénesis y microgametogénesis de *Barnadesia odorata*. A-D. Microsporogénesis. A. CMM envueltas en calosa, célula del tapete en anafase (flecha). B.

Microsporas con primexina. **C.** Microspora libre con exina avanzada en su desarrollo y endexina positiva para proteínas (flecha). **D.** Tapete polarizado, células con evaginaciones y núcleos hacia los lóculos. **E-H. Microgametogénesis.** **E.** Microsporas vacuoladas. **F.** Grano de polen 2-celular, célula generativa lenticular adosada a la pared (flecha). **G.** Células del tapete con contenido esporopolenínico (Rojo Neutro) y células del endotecio prismáticas. **H.** Grano de polen 2-celular con tapete degradado.

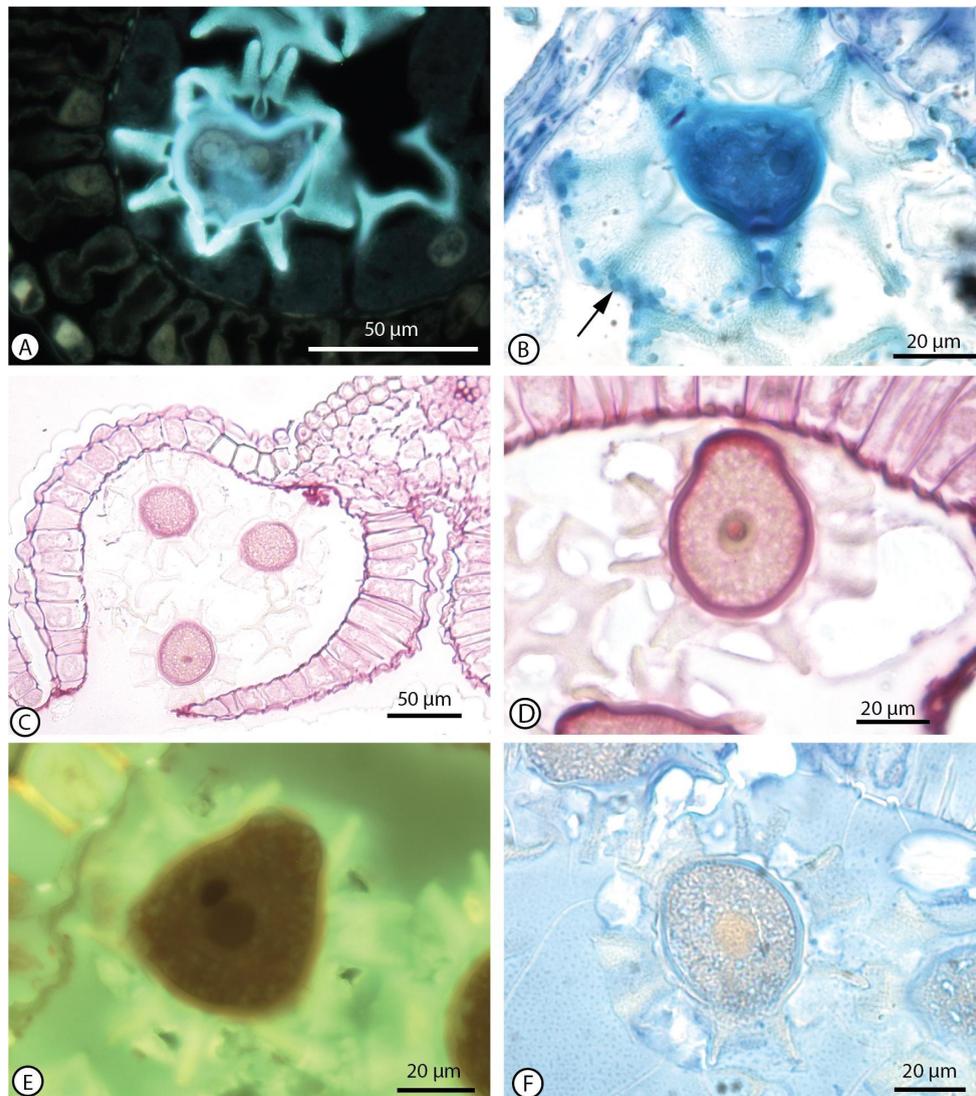


Figura 24. Microgametogénesis de *Barnadesia odorata*. Microgametogénesis. A. Englobamiento de la célula generativa y reducción de la vacuola de la célula vegetativa. **B.** Granos de polen con cuerpos de Ubisch adheridos a la exina (flecha). **C-F. Dehiscencia de las anteras.** **C.** Antera abierta, endotecio de células prismáticas granos de polen maduros. **D.** Endexina positiva para polisacáridos (PAS), citoplasma con glúcidos diluidos (tonalidad rosa uniforme). **E.** Grano de polen 2-celular con reservas lipídicas (Rojo Neutro). **F.** Endexina positiva para proteínas (Azul de Comassie).

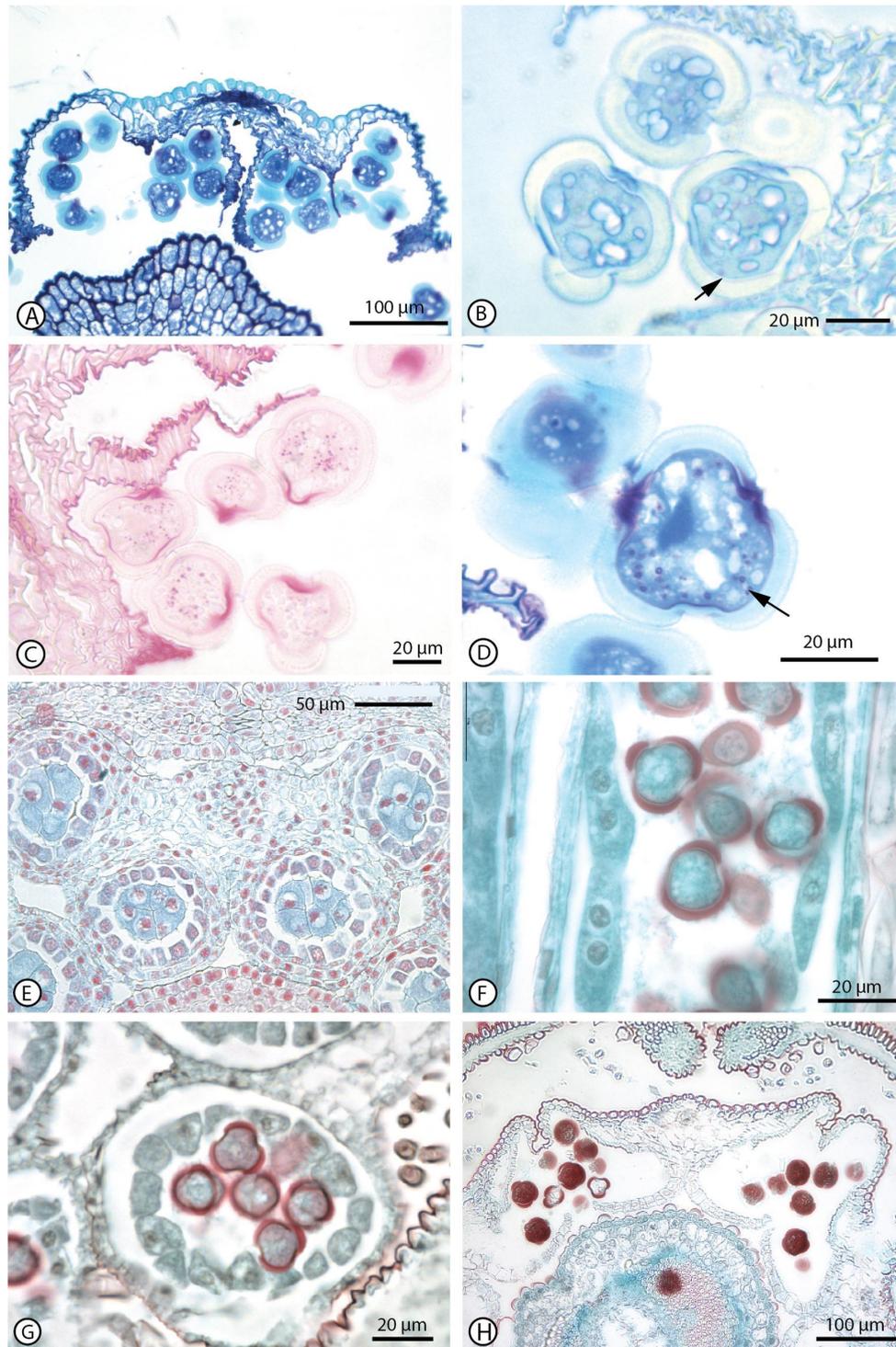


Figura 25. Microgametogénesis de *Chuquiraga aurea*. A. Dehiscencia de las anteras, remanente de septo interlocular. B. Endexina negativa para proteínas (flecha, Azul de Comassie) y vesículas con membrana proteica. C. Granos de polen *starchy* (PAS). D. Detalle de los granos de almidón (flecha), y esporodermis con exina de dos capas, endexina e intina engrosada en los colporos. **Microsporogénesis y Microgametogénesis de *Chuquiraga erinacea*.** E-F. E. **Microsporogénesis.** Multiplicación de arquésporas. F-G **Microgametogénesis.** F. CL de la antera mostrando el tapete de células binucleadas G. Granos de polen con exina desarrollada. H. Dehiscencia de anteras.

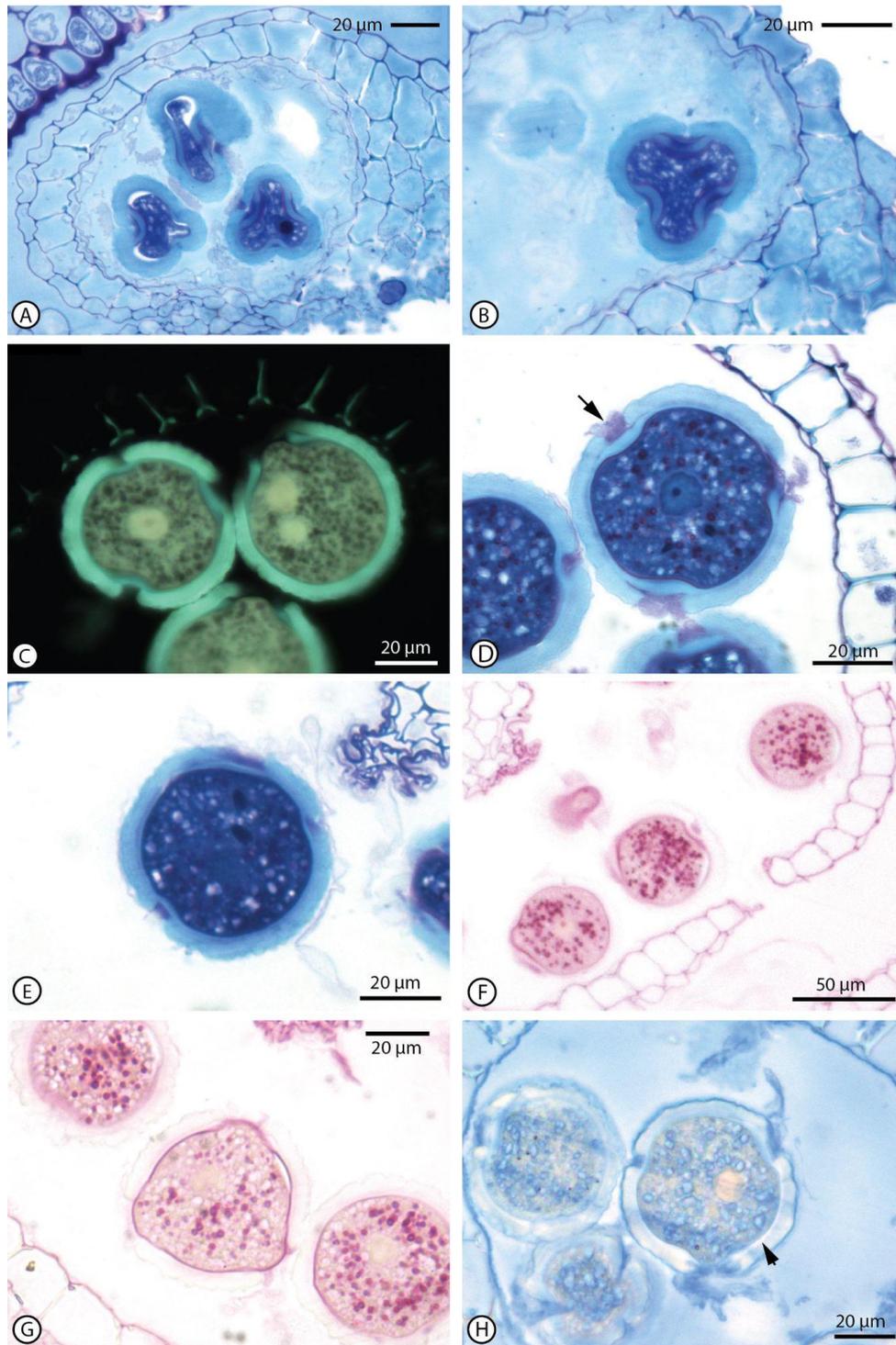


Figura 26. Microgametogénesis de *Chuquiraga jussieui*. A-B. Granos de polen deshidratados con. esporodermis desarrollada. A. Restos de tapete. B. Endexina e intina (engrosadas en los colporos). C-H. Dehiscencia de las anteras. C. Grano de polen de la derecha 2-celular (Auramina O). D. Colporos con sustancia pécticas (flecha). E. Núcleos de las células espermáticas. F-G. Granos de polen *starchy* (PAS). H. Endexina negativa para proteínas (flecha).

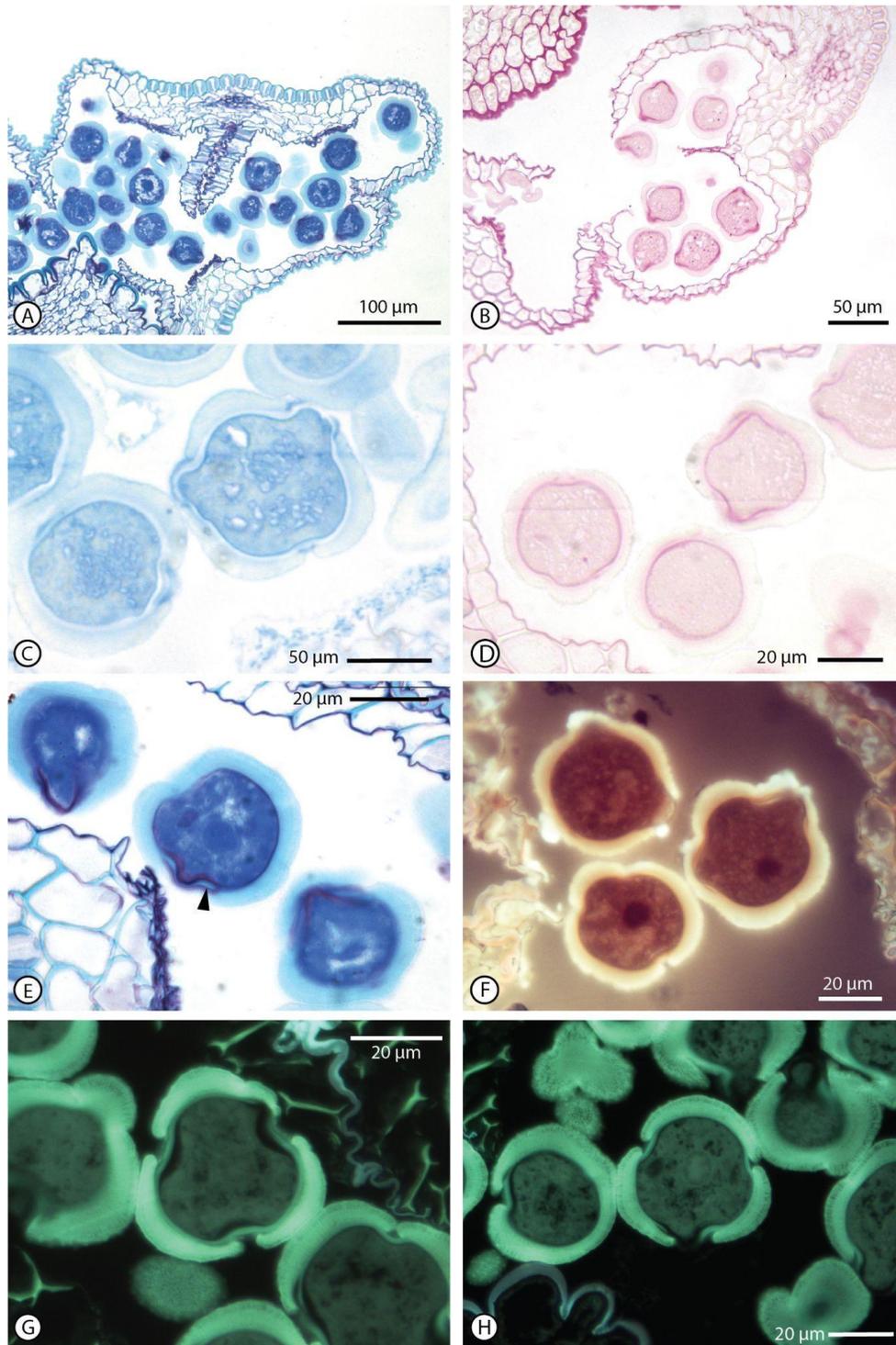


Figura 27. Microgametogénesis de *Chuquiraga parviflora*. **A.** Antera abierta. Endotecio de lóculos internos verticales. **B.** Granos de polen *starchy* con almidón escaso. (PAS). **C.** Endexina negativa para proteínas. **D.** Intina PAS positiva. **E.** Colporos con intina y endexina engrosadas. **F.** Granos de polen con núcleos de la célula vegetativa conspicuos. **G.** Intina y endexina engrosadas. **H.** Ectexina bicapa.

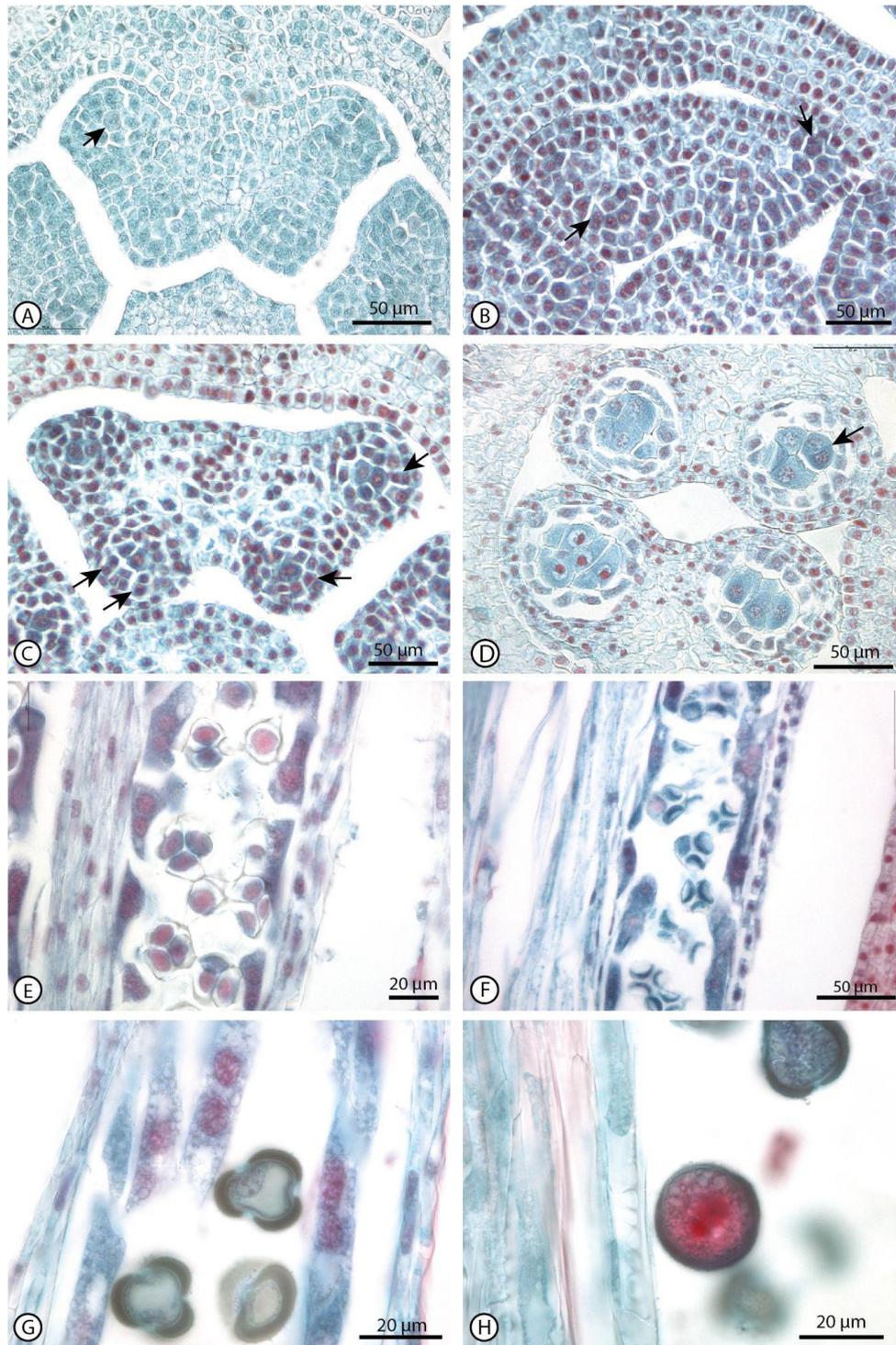


Figura 28. Esporangiogénesis de *Chuquiraga avellanae*. A: Esporangiogénesis. Primordio de la antera tetralobulada y arquéspora con PCD (flecha azul). **Esporangiogénesis, Microsporogénesis, Microgametogénesis de *Chuquiraga ruscifolia*. B-C. Esporangiogénesis.** B. Primordio de antera tetralobulada. C. Microesporangio con 3 capas Células iniciales subepidérmicas con divisiones periclinales (flecha), arquésporas con PCD. **D-F. Microsporogénesis.** D. Multiplicación de arquésporas (flecha). E. Tétrades de microsporas envueltas en calosa. F. Tétrades de microsporas envueltas en calosa y con primexina. **G-H. Microgametogénesis.** G. Microsporas vacuoladas con tapete de células binucleadas. H. Antera abierta. Grano de polen bicelular con vesículas

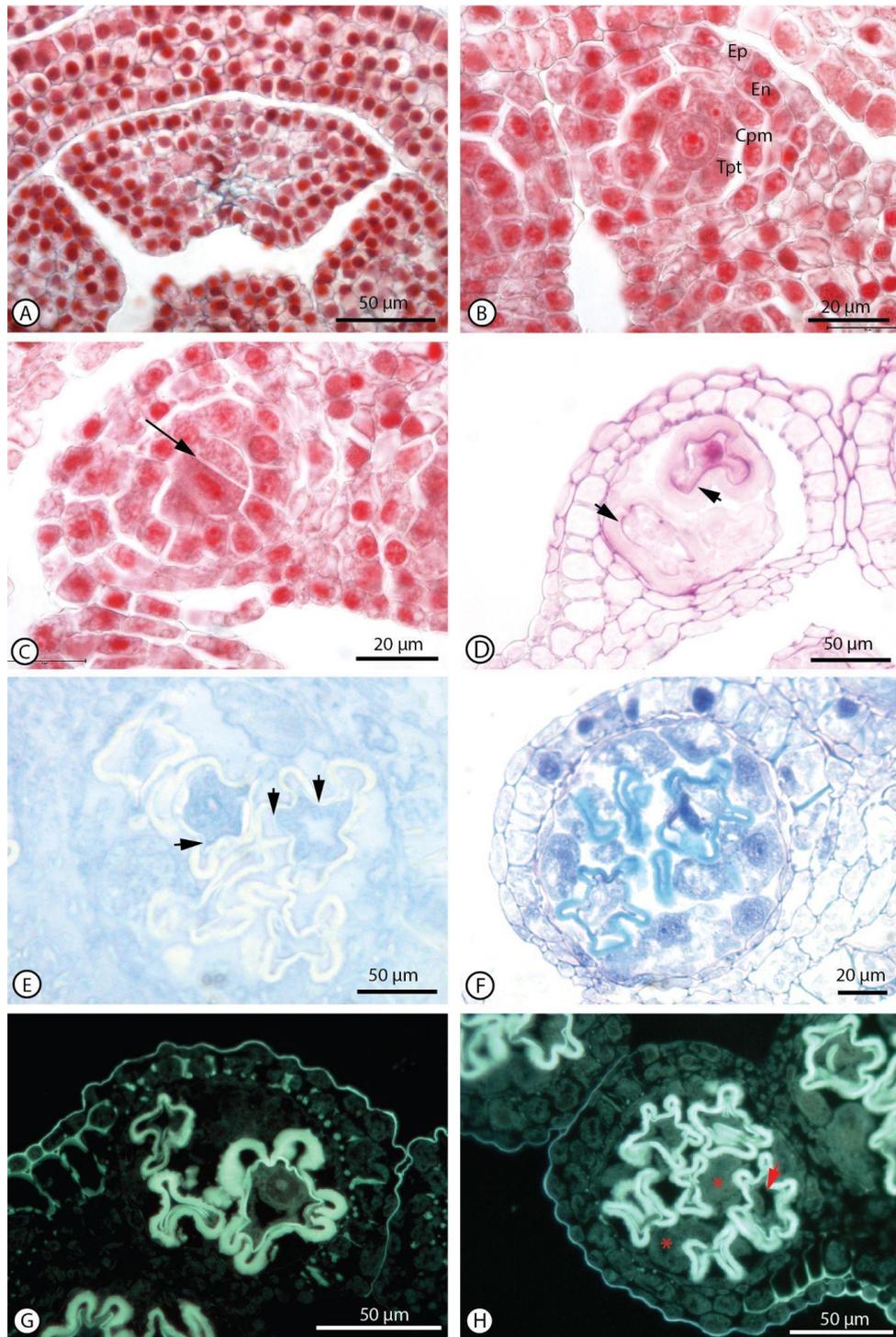


Figura 29. Esporangiógenesis, microsporogénesis y microgametogénesis de *Dasyphyllum brasiliense*. A-B. Esporangiógenesis. A. Primordio de antera tetralobulada. B. Microesporangio de cuatro capas y arqueósporas diferenciadas. C. Microsporogénesis. Multiplicación de arqueósporas (flecha). D-H. Microgametogénesis, microsporas vacuoladas. D. Endexina positiva para polisacáridos totales (flecha, PAS). E. Endexina negativa para proteínas (flecha). F. Tapete periplasmial, células invadiendo el lóculo. G. microspora con vacuola en formación. H. Microsporas con vacuolas en formación (flecha). Células del tapete entre las microsporas (asterisco). Ep: epidermis. En: endotecio. Cm: capa media. Tpt: tapete.

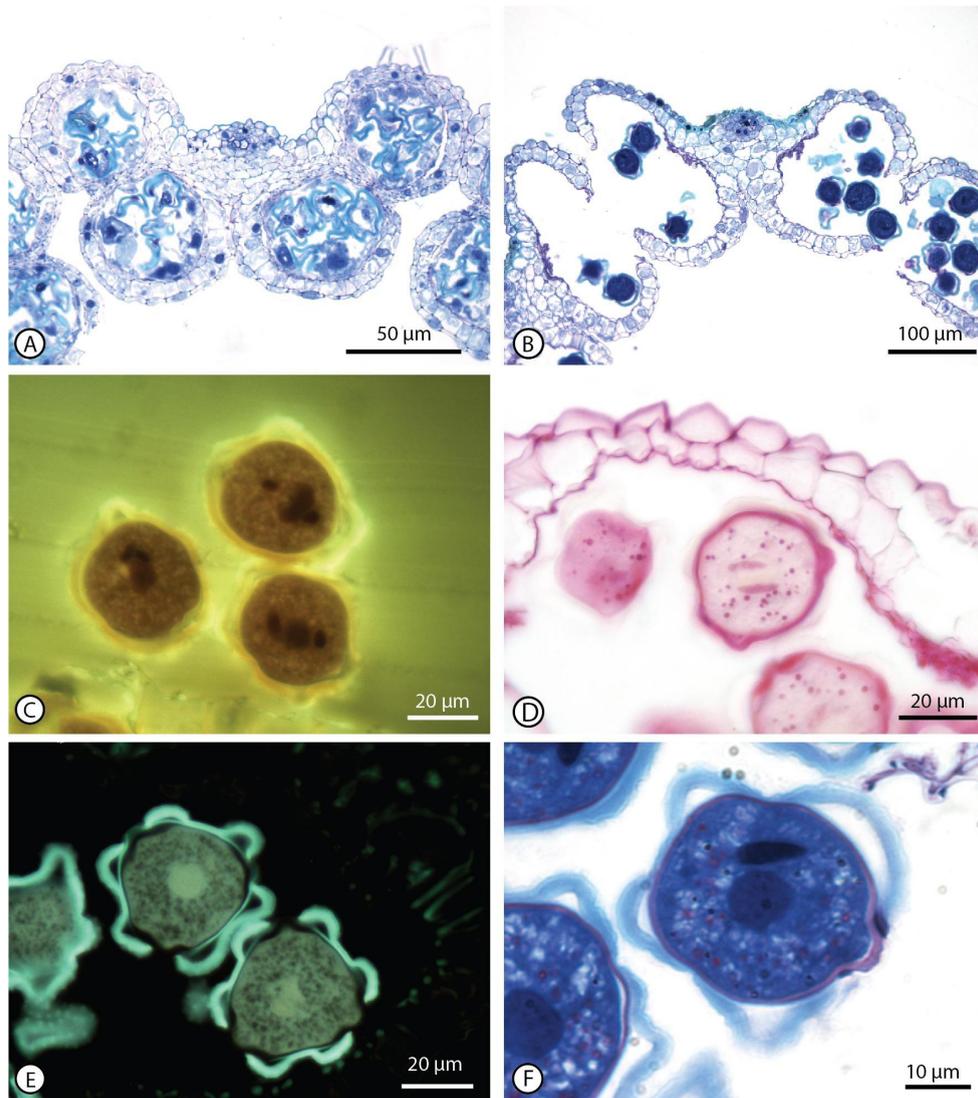


Figura 30. Microsporogénesis y microgametogénesis de *Dasyphyllum brasiliense*. Microsporogénesis A. Microsporas vacuoladas, antera tetralocular. **B.** Dehiscencia de la antera. **C-F. Microgametogénesis. C.** Granos de polen 3-celular. Reservas lipídicas. **D.** Granos de polen *starchy* con núcleos elongados de las células espermáticas, intina y endexina positivas para polisacáridos totales (PAS). **E.** Célula sifonogénica con núcleo prominente. Esporodermis: intina engrosada en los colporos, endexina, cáveas y ectexina bicapa. **F.** Célula sifonogénica con núcleo prominente y núcleo de célula gametogénica ahusado. Esporodermis: intina y endexina engrosadas en el colporo.

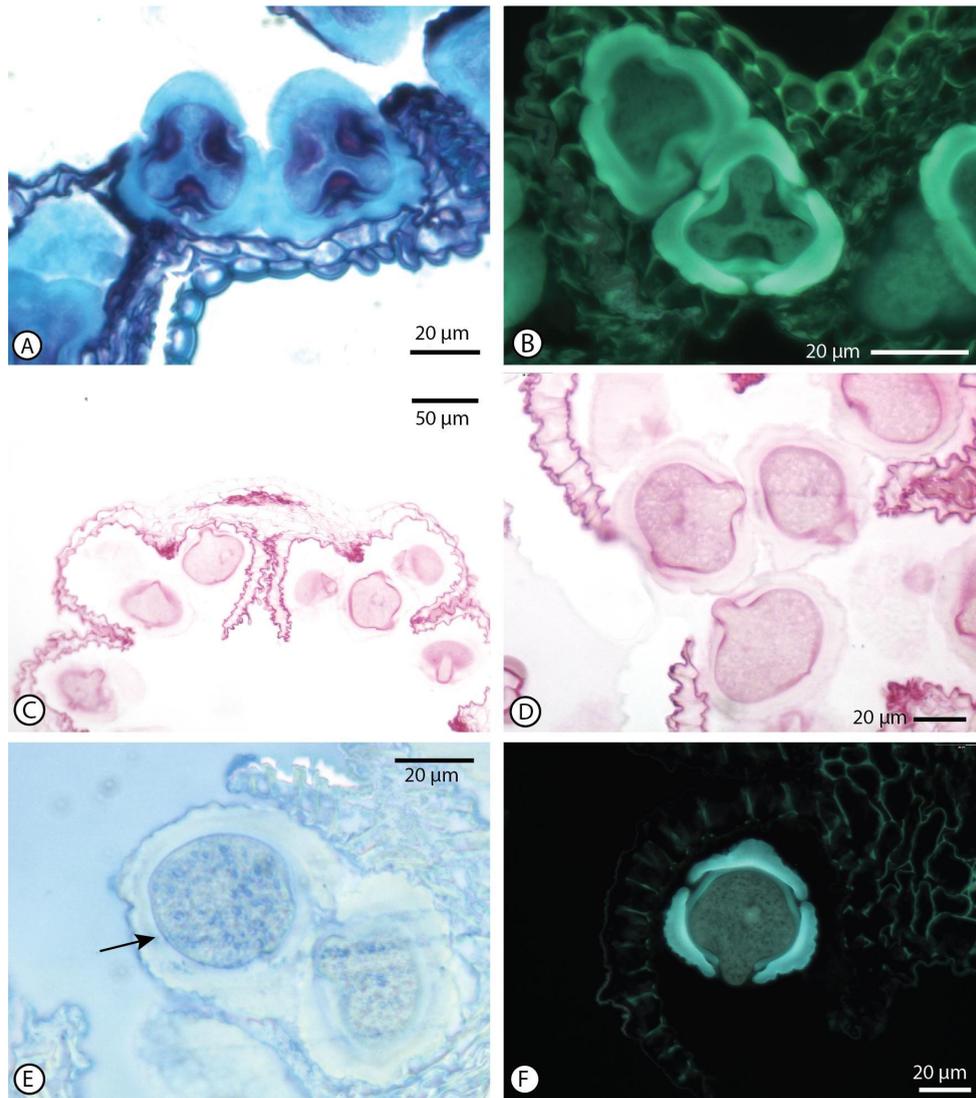


Figura 31. Microgametogénesis de *Doniophyton anomalum*. A-B. Granos de polen deshidratados, intina y endexina engrosadas en los colporos. C-D. Granos de polen *starchless* con glucidos diluidos en el citoplasma. Intina y endexina positivas para polisacáridos totales (PAS). E. Endexina positiva para proteínas (flecha). F. Grano de polen con célula sifonogénica con núcleo prominente protruyendo por el colporo. Esporodermis: endexina conspicua, ectexina bicapa.

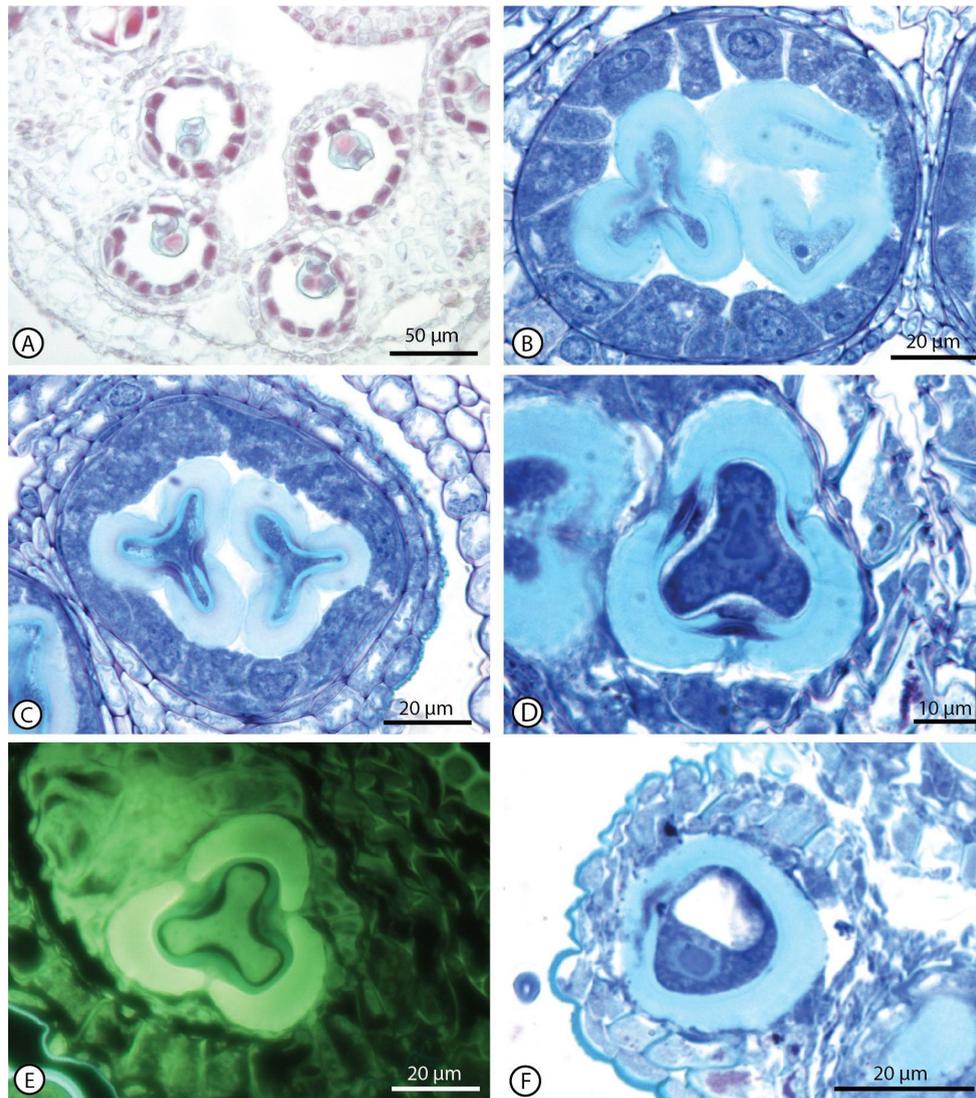


Figura 32. Microsporogénesis de *Doniophyton weddellii*. **A.** Tétradas de microsporas envueltas en calosa. **B.** Microsporas con exina desarrollada, tapete en actividad. **C.** Tapete en degradación, comienzo de formación del periplasmodio. **D.** Microspora acumulando reservas, intina y endexina engrosadas en los colporo Tapete degradado invadiendo el lóculo. **E.** Esporodermis diferenciada, tapete periplasmodial. **F.** Microspora vacuolada. Restos de tapete.

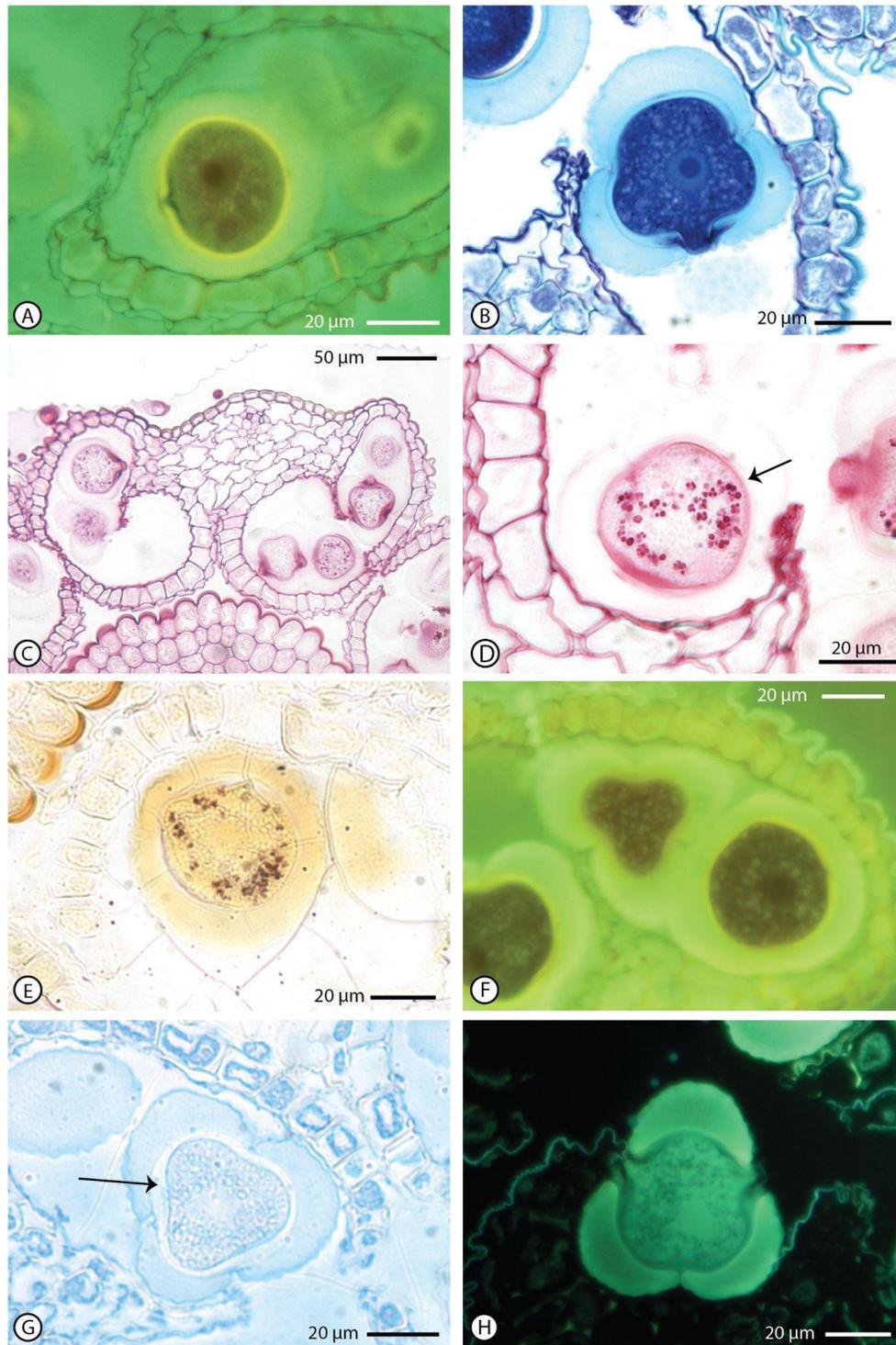


Figura 33. Microgametogénesis de *Doniophyton weddellii*. **A.** Grano de polen 2-celular. Endexina reactiva (Rojo Neutro). **B.** Célula sifonogénica con núcleo prominente emergiendo por el colporo. **C.** Anteras biloculares. Septo interlocular retraído. **D.** Granos de almidón. Endexina negativa para polisacáridos (flecha). **E.** Granos de almidón (Lugol). **F.** Lípidos de reserva (Rojo neutro). **G.** Endexina negativa para proteínas (Azul de Comassie). **H.** Célula sifonogénica emergiendo por el colporo. Endexina. Ectexina bicapa (Auramina O).

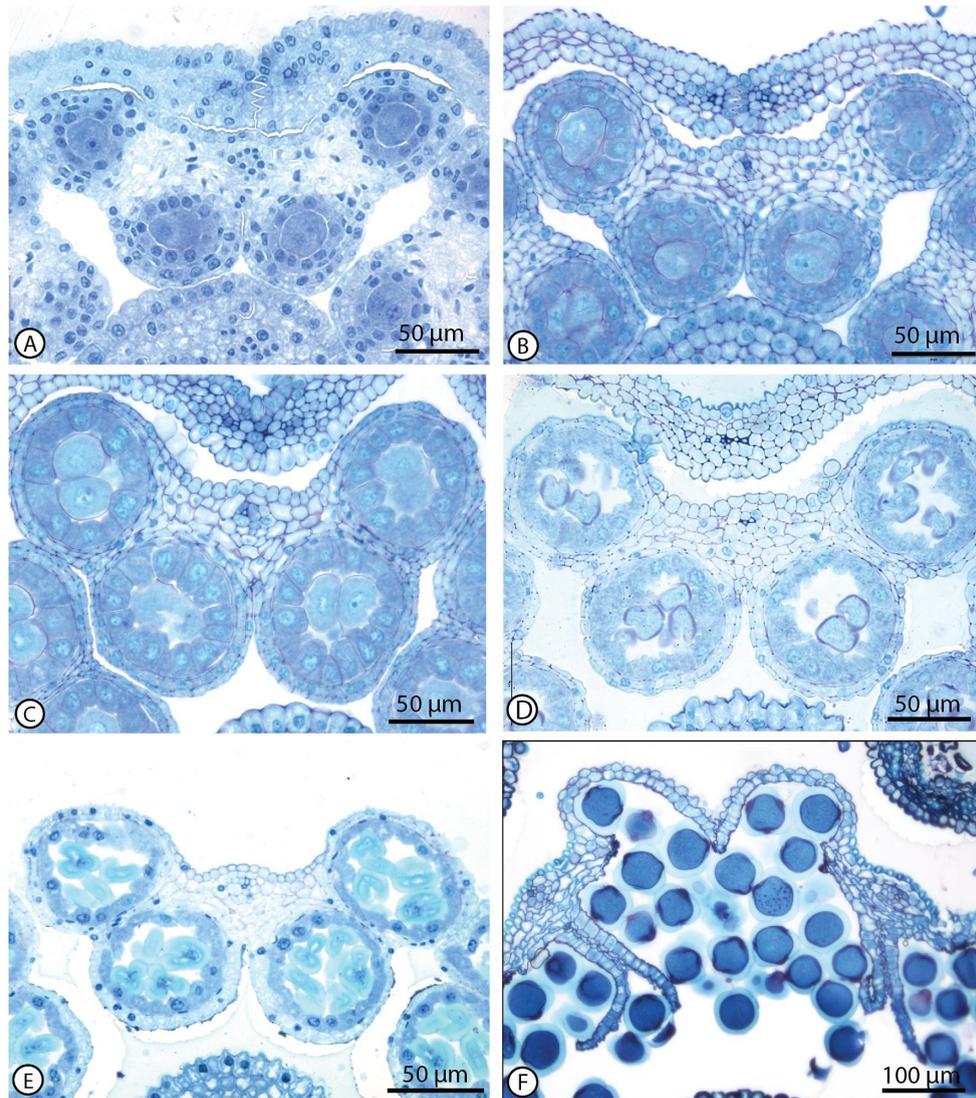


Figura 34. Esporangiógenesis, microsporogénesis y microgametogénesis de *Dusenilla patagonica*. **A Esporangiógenesis.** Pared de antera con las 4 capas segregadas. Arquésporas con diferenciación celular premeiótica (DCP). **B-D. Microsporogénesis.** **B.** Multiplicación de arquésporas. Tapete en actividad. **C.** CMM con envoltura de calosa. Tapete con células binucleadas. **D.** Microsporas libres con primexina. **E-F. Microgametogénesis.** **E.** Vacuolización de microsporas. **F.** Dehiscencia.

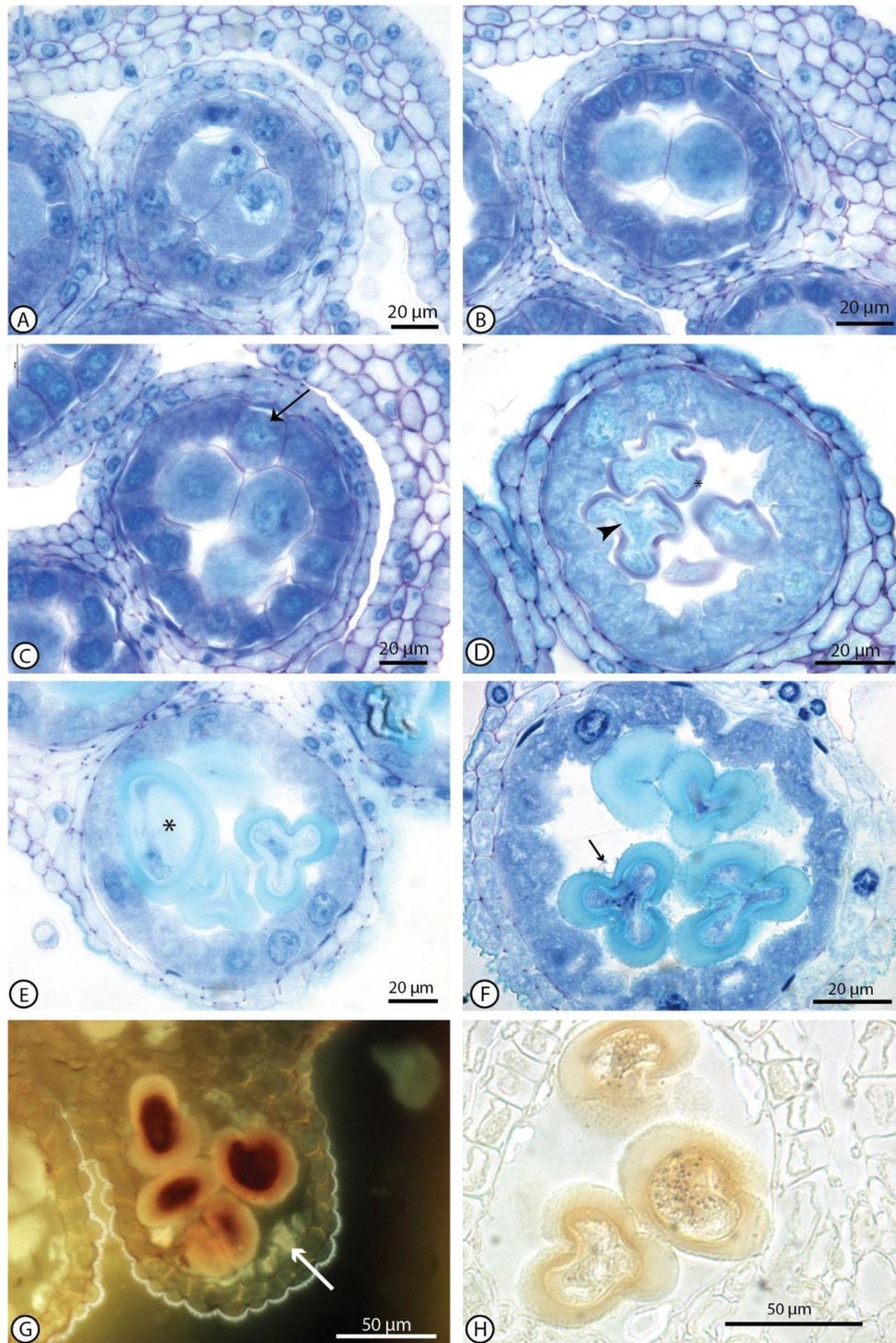


Figura 35. Microsporogénesis y microgametogénesis de *Dusenilla patagonica*. A-D Microsporogénesis. A-B. CMM con envoltura de calosa. Tapete en actividad. **C.** Gradiente de DCP extendido a célula del tapete (flecha). **D.** Microspora con primexina (asterisco) y endexina (flecha) formadas. Tapete secretor polarizado. **E-H Microgametogénesis. E.** Microsporas vacuoladas (asterisco). Exina desarrollada. **F.** Exina con cuerpos de Ubish adheridos (flecha) y sobre membrana peritapetal. **G.** Restos de tapete en el lóculo (flecha), positivos para esporopolenina (Rojo Neutro). **H.** Granos de almidón (Lugol).

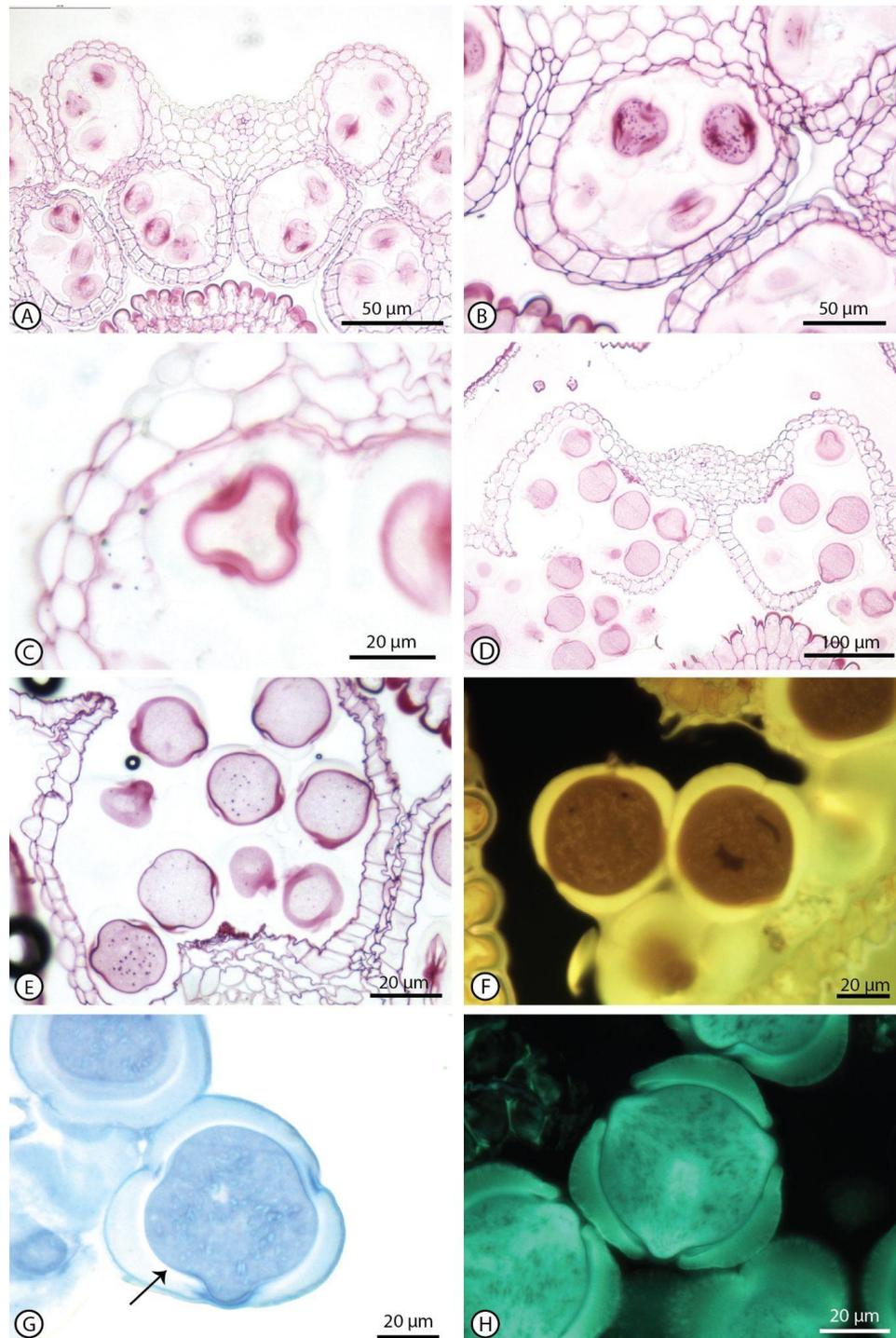


Figura 36. Microgametogénesis de *Dusenilla patagonica*. **A.** Granos de polen deshidratados. Antera tetralocular. **B.** Granos de polen con reservas abundantes de granos de almidón. Células del endotecio prismáticas. **C.** Intina y endexina positivas para polisacáridos (Rojo de rutenio). **D.** Dehiscencia. Citoplasma con glúcidos diluidos (PAS). **E.** Granos de almidón escasos. **F.** Núcleos de células espermatógenas. Reservas lipídicas (Rojo Neutro). **G.** Endexina negativa para proteínas (flecha). **H.** Célula sifonogámica emergiendo por los colpos. Endexina y ectexina bicapa.

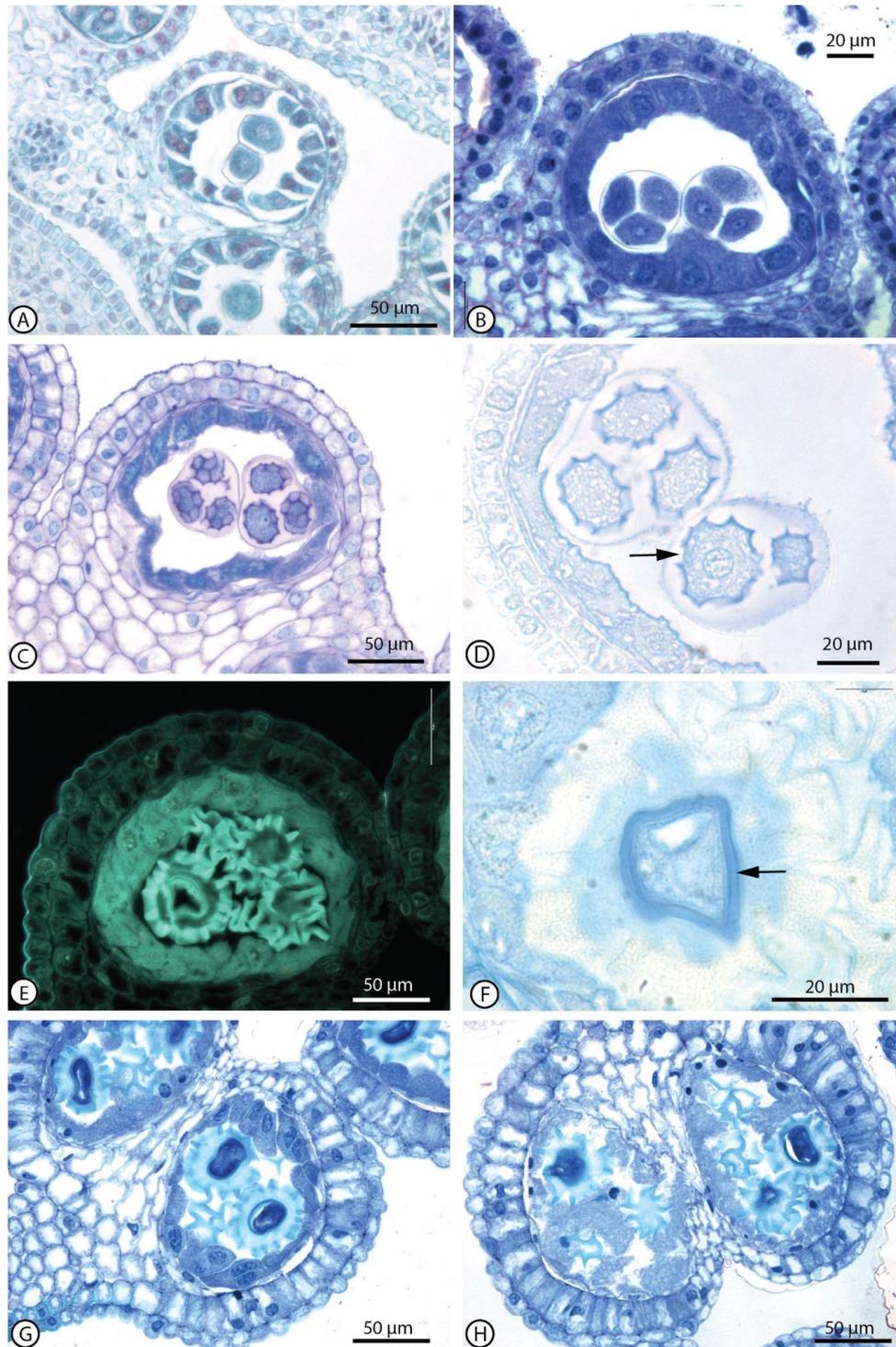


Figura 37. Microsporogénesis y microgametogénesis de *Huarpea andina*. A-D. Microsporogénesis. A. CMM con envoltura de calosa. B. Tétradas de microsporas con envoltura de calosa. C. Tétradas de microsporas con primexina envueltas en calosa. D. Primexina positiva para proteínas. Colporo definido (flecha). E-H. Microgametogénesis. E. Microsporas vacuoladas. Tapete formando el periplasmodio (paredes periclinales interdigitadas). F. Endexina positiva para proteínas (flecha). G. Tapete formando el sincicio., células perdiendo la disposición concéntrica. H. Periplasmodio. Células invadiendo el lóculo.

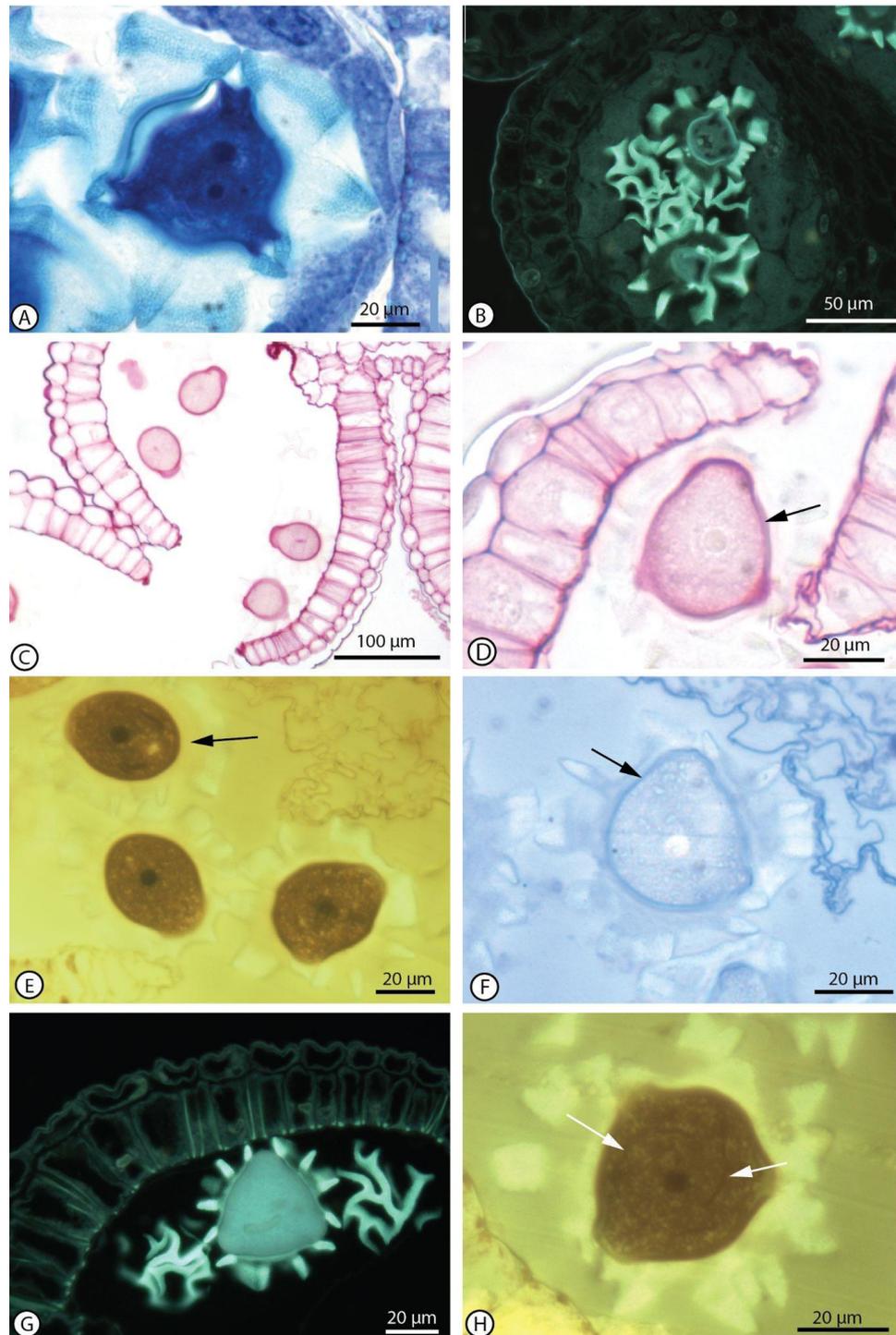


Figura 38. Microgametogénesis de *Huarpea andina*. **A.** Grano de polen 2-celular. **B.** Tapete periplasmoidal. **C-H.** Dehiscencia. Granos de polen con glúcidos diluidos en el citoplasma. **D.** Endexina positiva para polisacáridos totales (flecha). **E.** Grano de polen 3-celular (flecha), núcleos filiformes de las células espermáticas. **F.** Endexina positiva para proteínas (flecha). **G.** Ectexina unicapa. **H.** Grano de polen 3-celular con núcleos filiformes de las células espermáticas.

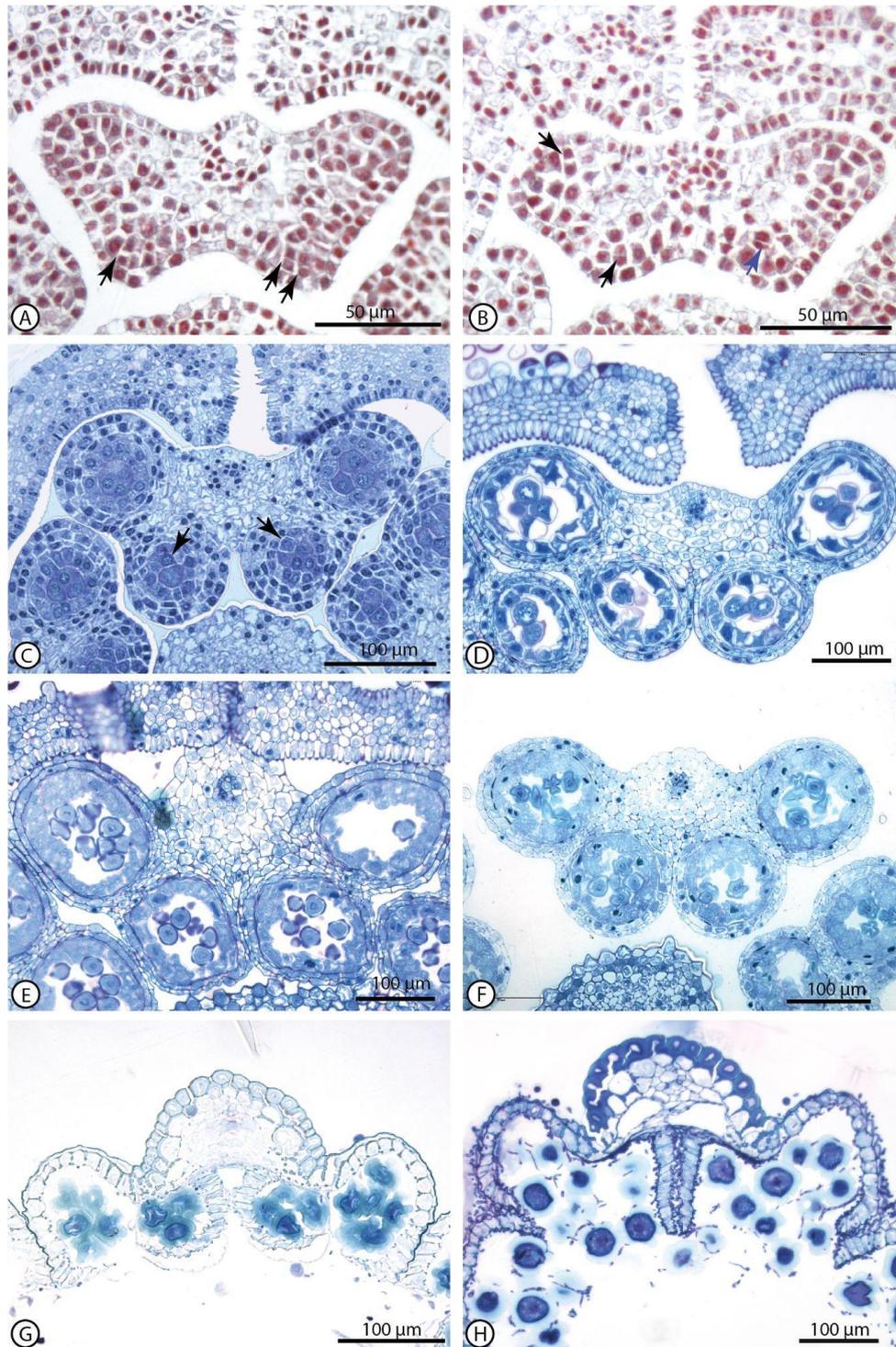


Fig. 39. Esporangioénesis, microsporogénesis y microgametogénesis de *Schlechtendalia luzulifolia*. A-C Esporangioénesis. A-B. Primordio de antera tetralobulada. Células iniciales subepidérmicas con divisiones periclinales (flechas) y multiplicación de arquésporas (flecha azul). **C.** Microsporangio con las 4 capas. Arquésporas con PCD. Gradiente del PCD extendido a células del tapete (flecha). **D-E Microsporogénesis. D.** Meiosis II. **E.** Microsporas con primexima. Células del tapete binucleadas con evaginaciones. **F-H. Microgametogénesis. F.** Microsporas libres. Exina en desarrollo. Tapete activo comenzando a desorganizarse. **G.** Granos de polen deshidratados. **H.** Dehiscencia.

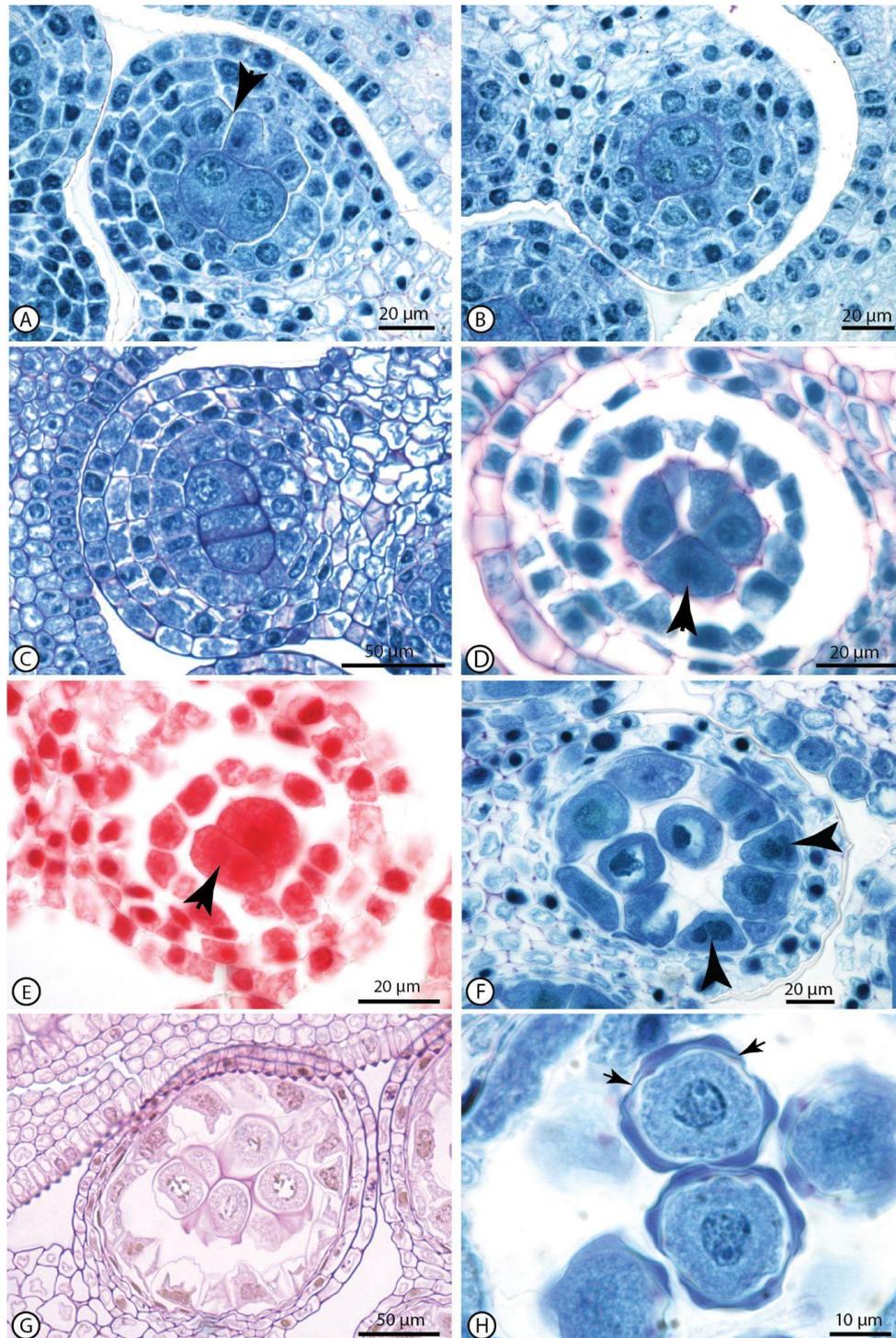


Figura 40. Esporangioénesis y microsporogénesis de *Schlechtendalia luzulifolia*. A-C Esporangioénesis. A. Microsporangio de 4 capas. Arquésporas con DCP. Gradiente del DCP extendido a células del tapete (flecha). B-C. Arquésporas con diferenciación celular premeiótica (DCP). D-H. Microsporogénesis. D-E. Multiplicación de arquésporas (flechas). F. CMM. Células del tapete binucleadas (flechas). G. CMM envueltas en calosa. H. Microsporas con primexina y endexina (flecha).

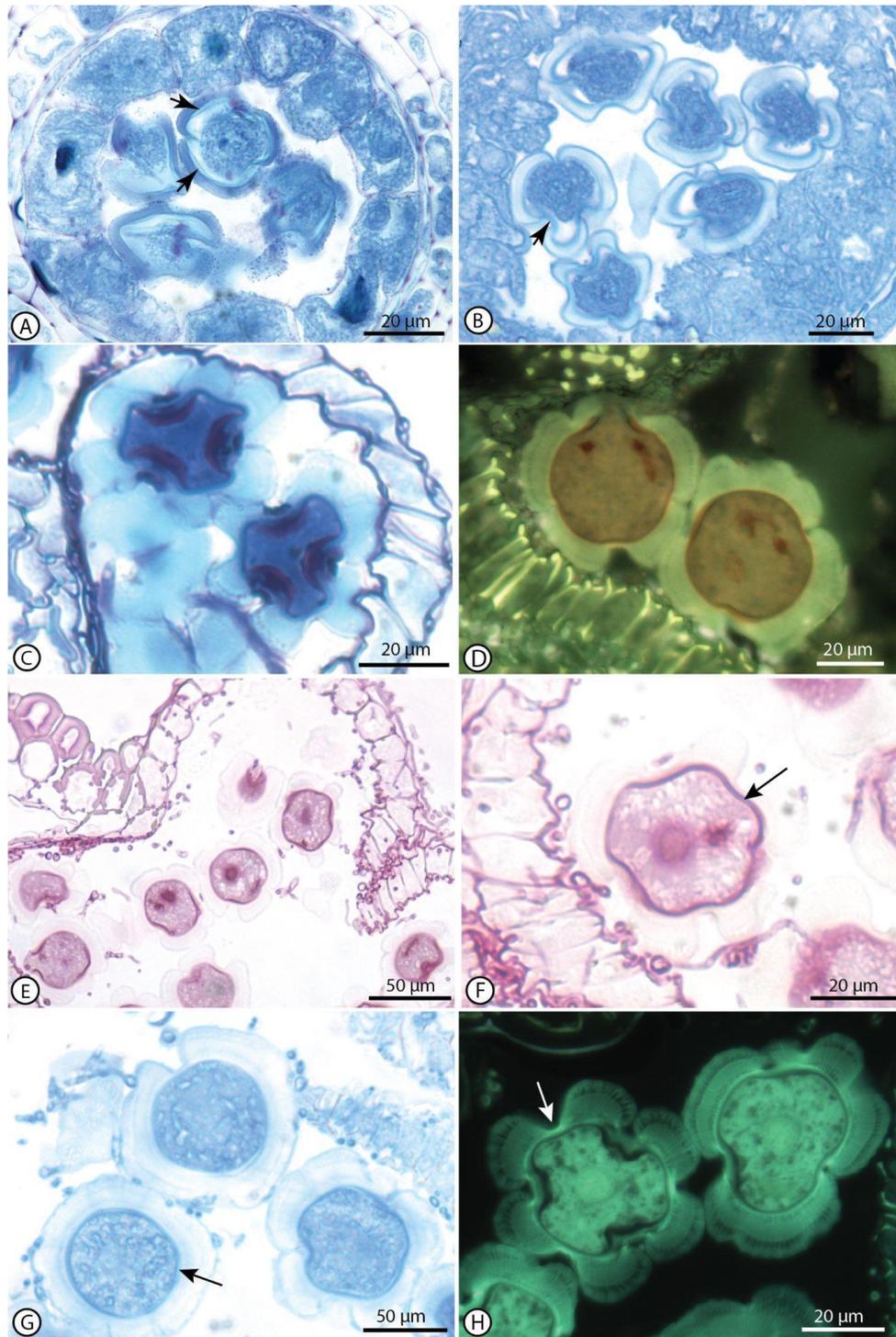


Figura 41. Microsporogénesis y microgametogénesis de *Slechtendalia luzulifolia*. A-B Microsporogénesis. A. Endexina desarrollada (flechas), ectexina en desarrollo. Tapete en actividad. Cuerpos de Ubisch adheridos a la exina y membrana peritapetal. B. Endexina positiva para proteínas (flecha). C-H Microgametogénesis. C. Granos de polen deshidratados. Intina y endexina engrosadas en los colpos. D. Granos de polen 3-celulares. E. Granos de polen con glúcidos diluidos en el citoplasma. F. Intina positiva para polisacáridos totales. G. Intina y endexina reactivas para proteínas. H. Ectexina tricapa, con tecto interno muy grueso. Depresiones intercolpares (flecha).

4.2.4 Dehiscencia de las anteras: mecánica y tejidos involucrados

Durante la vacuolización de las microsporas y la desorganización del tapete comienzan los cambios en los tejidos mecánicos de la antera para permitir su dehiscencia. Los tejidos involucrados en este proceso son el endotecio, el conectivo, la hipodermis conectiva y la epidermis (Fig. 42).

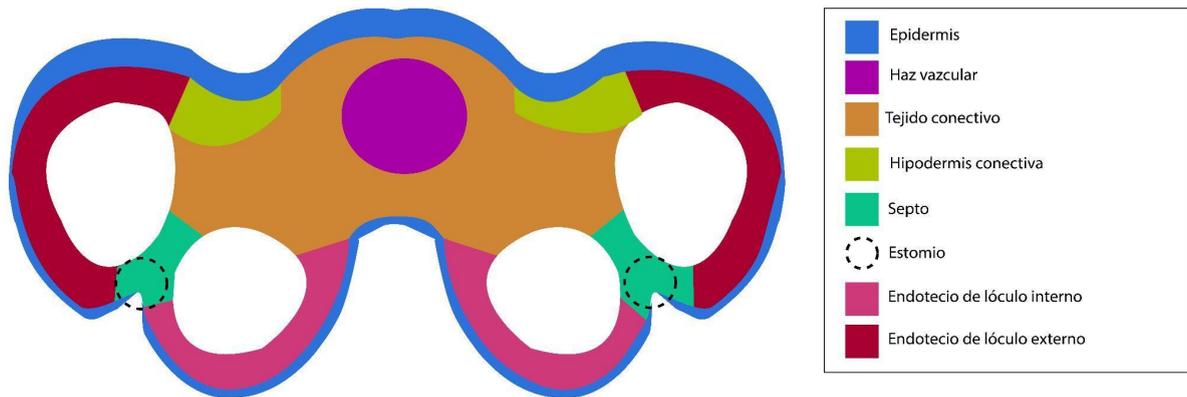


Figura 42. Esquema simplificado de un corte transversal de las anteras indicando los tejidos que las componen.

El análisis de las anteras en corte transversal permitió identificar la hipodermis conectiva, es decir, una zona de transición entre el tejido conectivo, el endotecio de los lóculos externos y la epidermis, caracterizada por presentar engrosamientos anulares y gruesos similares a los de la epidermis que se adelgazan adquiriendo forma de U o herradura abierta hacia el centro de la antera y que puede ser continua o discontinua (Fig. 43).

La hipodermis conectiva puede ser continua como en *Huarpea andina* (Fig. 48 E-F) o discontinua como en el resto de las especies (Figs. 47, 48 A-D, 49).

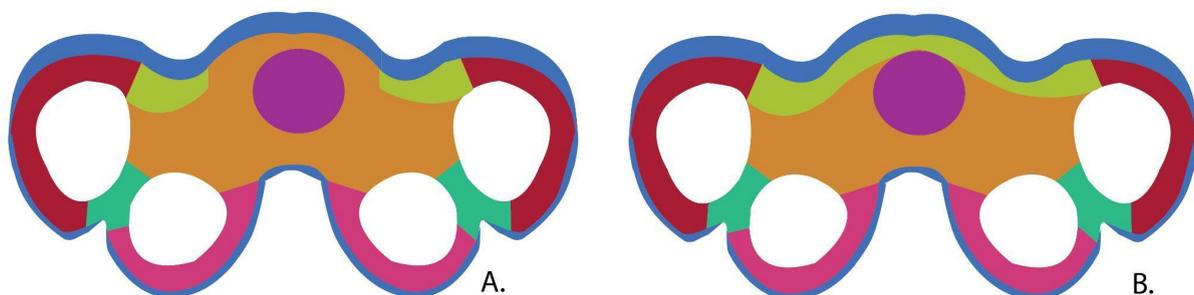


Figura 43. Esquema simplificado de un corte transversal de las anteras indicando hipodermis conectiva (en verde musgo): **A.** Discontinua. **B.** Continua.

En orden cronológico suceden los siguientes cambios: las células del endotecio aumentan de tamaño adquiriendo forma rectangular, luego la epidermis y la hipodermis conectiva (zona de transición conectivo-endotecio-epidermis) se engrosan, y finalmente el conectivo y el endotecio desarrollan diferentes tipos de engrosamientos (Fig. 44).

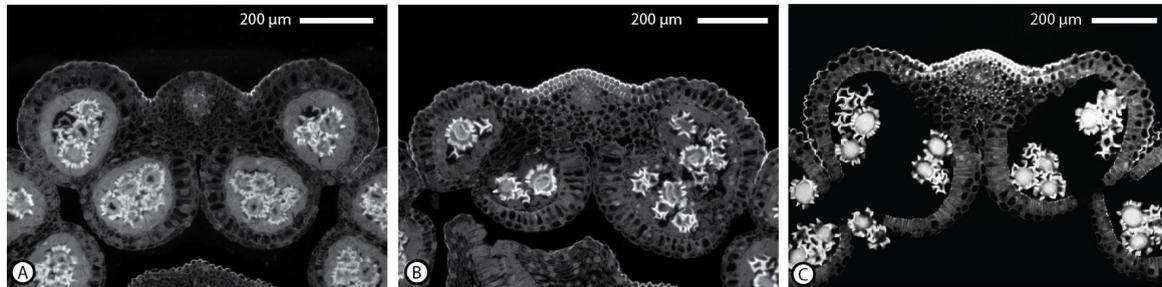


Figura 44. Cronología de cambios en las capas mecánicas de la antera en *Huarpea andina*. A. Células del endotecio rectangulares . **B.** Epidermis y la hipodermis conectiva con engrosamientos. **C.** Tejido conectivo y endotecio con engrosamientos.

El tejido conectivo adquiere engrosamientos fibrosos que pueden ser de dos tipos: (1) longitudinales, en corte transversal se observan como grupos de cuatro o cinco puntos o bandas cortas como en *Huarpea andina*, (Fig 48 E-F) u ocho o nueve por célula como en *Barnadesia odorata* (Fig 48 A-B) o (2) circulares o anulares donde las células tendrán todo el perímetro de sus paredes engrosado como se observa para *Chuquiraga aurea* (Fig. 47 A-B), *C. jussieui* (Fig. 47 C-D), *C. parviflora* (Fig. 47 E-F), *Doniophyton anomalum* (Fig. 47 G), *D. weddellii* (Fig. 47 H). En tanto *Dasyphyllum brasiliense*, presenta una combinación de bandas cortas y anillos, en la periferia y centro del tejido conectivo (Fig. 49 E), mientras que *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 49 A-B, D) no presenta engrosamientos en este tejido.

Los engrosamientos del endotecio son los últimos en formarse y se observaron tres tipos (Fig. 45): (1) en forma de barras transversales, en corte transversal se ven como barras yuxtapuestas sobre las paredes anticlinales de las células., (2) en forma de barras transversales inclinadas, en corte transversal se observan como Y griegas, con la bifurcación de la Y hacia el interior de los lóculos, y (3) engrosamientos longitudinales y oblicuos que en corte transversal se observan como puntos, sobre las paredes periclinales internas.

Seis especies presentaron endotecio con sólo engrosamientos en barras transversales en ambos lóculos, en *Chuquiraga aurea* (Fig. 47 A-B), *C. jussueiu* (Fig. 47 C-D), *C. parviflora* (Fig. 47 E-F), *Doniophyton anomalum* (Fig. 47 G), *D. weddellii* (Fig. 47 H), *Schlechtendalia luzulifolia* (Fig. 49 A-D), mientras que *Huarpea andina* presentó sólo engrosamientos longitudinales (Fig. 48 E-H), y *Barnadesia odorata* (Fig. 48 A-D) y *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 49 E-H) presentaron una combinación de los tres tipos (barras transversales, barras transversales oblicuos y longitudinales).

En todas las especies analizadas, el endotecio está más engrosado en los lóculos externos. En la zona del estomio y el septo interlocular no hay engrosamientos, sino células epidérmicas no cutinizadas y células parenquimáticas como se observó para *Dasyphyllum brasiliense* (Fig. 49 E), *Barnadesia odorata* (Fig. 48 A) y *Chuquiraga jussieui* (Fig. 47 C).

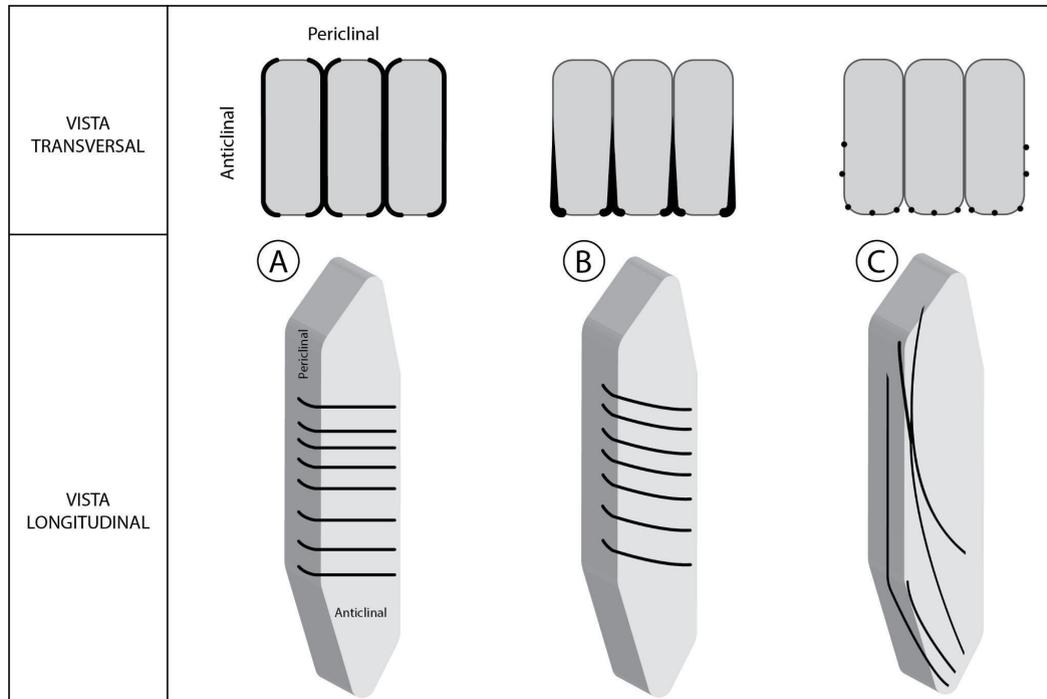


Figura 45. Esquema simplificado de células del endotecio con sus engrosamientos. A. Engrosamientos en barras transversales. **B.** Engrosamientos en barras transversales inclinadas. **C.** Engrosamientos longitudinales.

La dehiscencia se inicia cuando el septo interlocular se retrae por completo y las anteras pasan de ser tetraloculares a biloculares y finalmente el estomio se abre. Esta secuencia fue observada en *Chuquiraga parviflora*, (Fig. 47 E) y las paredes internas de los lóculos internos se van desplazando hasta quedar yuxtapuestas y perpendiculares al eje mayor de las anteras como en *Schlechtendalia luzulifolia*, (Fig. 49 B), *Chuquiraga aurea*, (Fig. 47 A-B), *Doniophyton anomalum* (Fig. 47 G).

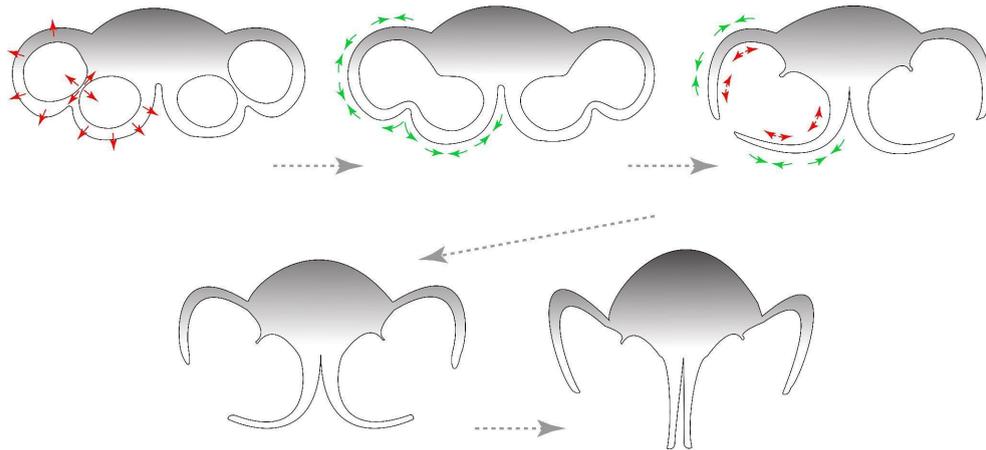


Figura 46. Esquema simplificado del mecanismo de apertura de las anteras. Detalle de anteras indicando engrosamientos en la pared externa y septo (flechas transversales y flechas cruzadas, respectivamente).

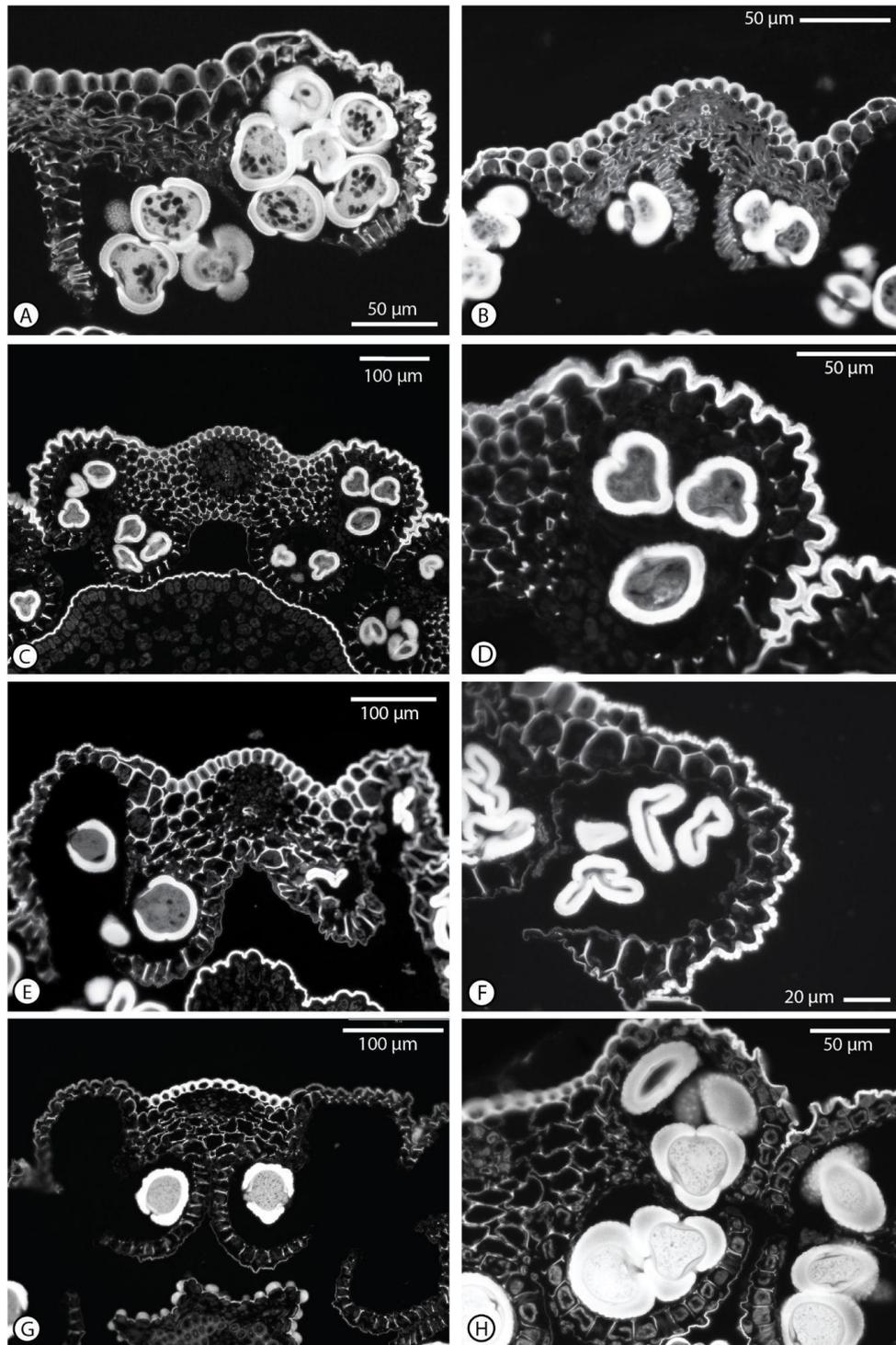


Figura 47. Tejidos mecánicos de la antera. Tejido conectivo con engrosamientos en anillo, hipodermis conectiva discontinua y endotecio con engrosamientos en barras transversales. **A-B.** *Chuquiraga aurea*. **C-D.** *Chuquiraga jussieui*. **E-F.** *Chuquiraga parviflora*. **G.** *Doniophyton anomalum*. **H.** *Doniophyton weddellii*.

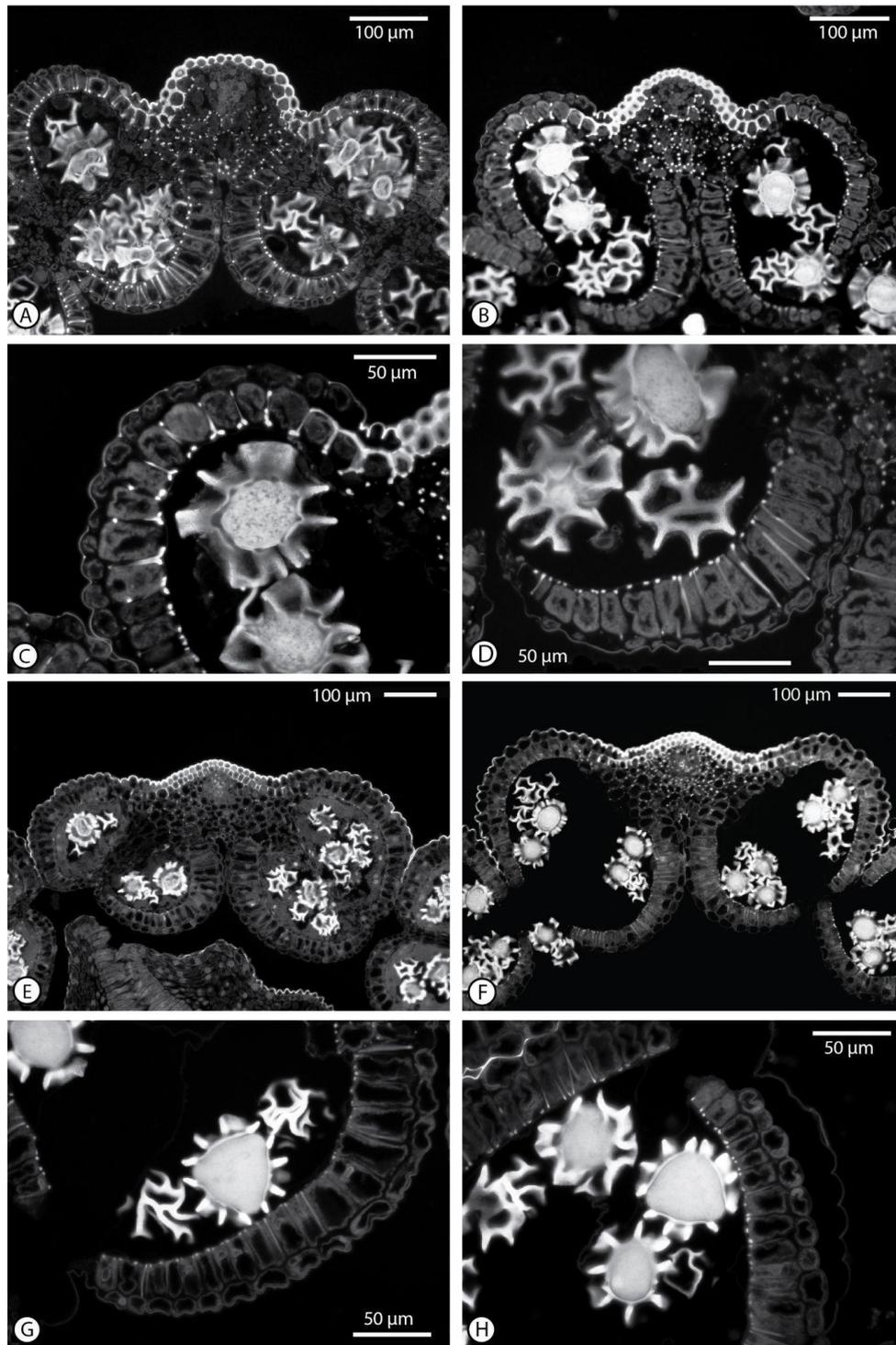


Figura 48. Tejidos mecánicos de la antera. A-D. *Barnadesia odorata*. A-B. Tejido conectivo con engrosamientos en bandas cortas. Hipodermis conectiva discontinua. **C.** Lóculo dorsal, endotecio con engrosamientos en barras transversales inclinadas. **D.** Lóculo ventral: endotecio con engrosamientos longitudinales. **E-H. *Huarpea andina*. E-F.** Tejido conectivo con engrosamientos en bandas cortas. Hipodermis continua. **G-H.** Endotecio con engrosamientos longitudinales, zona del estomio.

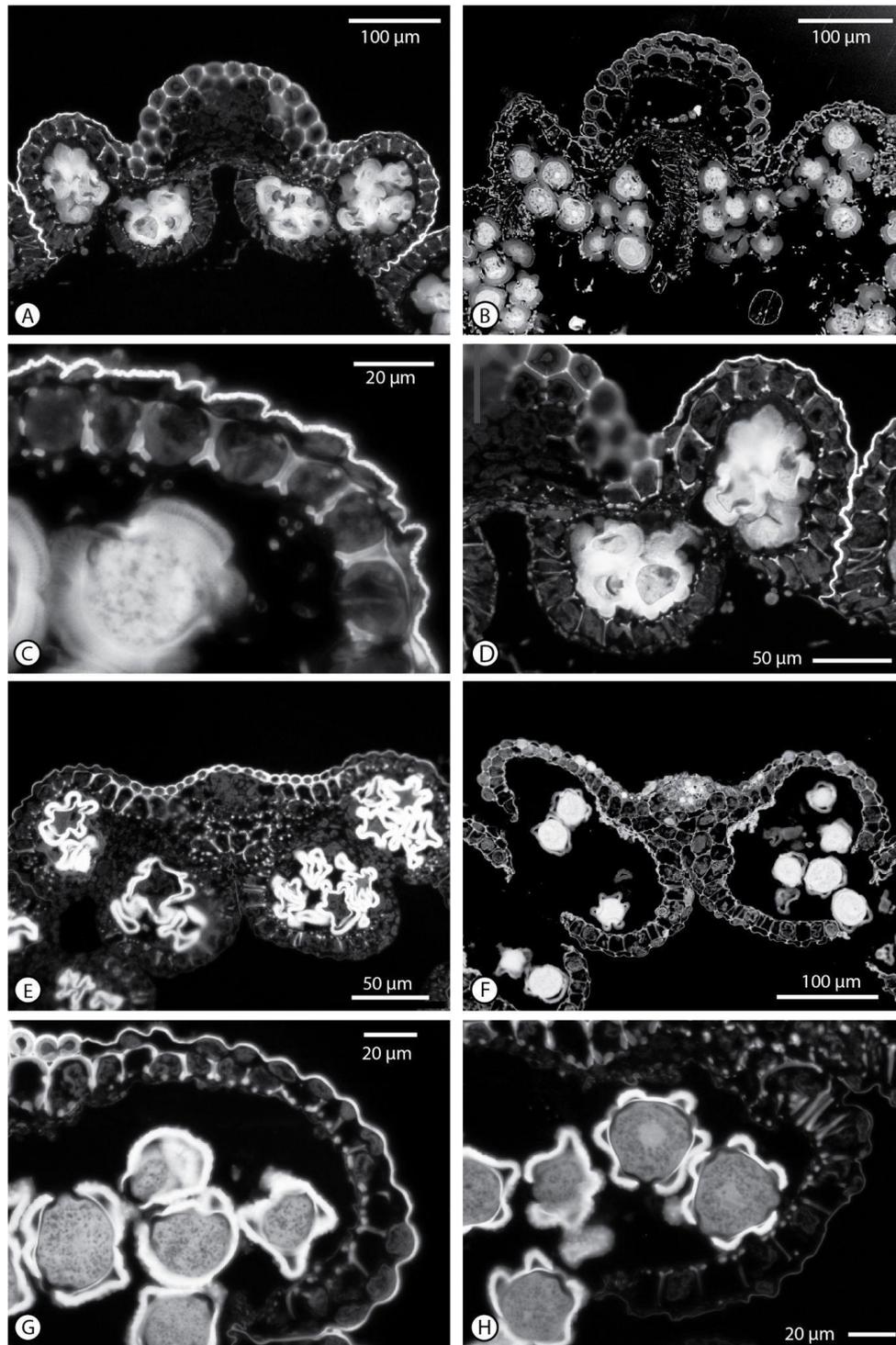


Figura 49. Tejidos mecánicos de la antera. A-D. *Slechtendalia luzulifolia*. A-B. Hipodermis conectiva. Engrosamientos del tejido conectivo ausentes. **A.** Granos de polen deshidratados. **B.** Dehiscencia de las anteras. **C.** Engrosamientos en barras transversales. **D.** Lóculos ventrales con engrosamientos menos acentuados. **E-H *Dasyphyllum brasiliense*. E.** Hipodermis conectiva discontinua. Tejido conectivo con engrosamientos en anillos y en bandas cortas. **F.** Dehiscencia de las anteras. **G.** Lóculo dorsal con engrosamientos en barras y longitudinales. **H.** Lóculo ventral con engrosamientos longitudinales.

4.3 Desarrollo de ovarios, óvulos y semillas

4.3.1 Ovarios y óvulos

La primera diferenciación del óvulo se establece con la iniciación del nucelo y la curvatura de 90 grados del funículo, como se observa en *Duseniella patagonica* (Fig. 57, A-B) y *Huarpea andina*, (Fig. 59 A-B).

El crecimiento diferencial del funículo termina girando la nucela a su posición primero hemítropa y finalmente anátropa. Simultáneamente se diferencia una nucela alargada y delgada, con solo 2 ó tres hileras de células subepidérmicas, y avanza el desarrollo del único tegumento masivo que cubre completamente la nucela generando una estructura asimétrica, convexa, opuesta al funículo, como se observa en *Barnadesia arborea* (Fig. 50 B-C) y *B. odorata* (Figs. 51, A, 52 A).

Sólo una célula nucelar subepidérmica apical se diferencia como arquéspora y presenta las características de diferenciación celular premeiótica (DCP).

Todas las especies estudiadas poseen óvulos con una única célula arqueospórica hipodérmica y tenuinucelados incompletos, sin capa o células hipodérmicas entre la arquéspora y el ápide nucelar pero con tejido hipodérmico en los flancos nucleares y debajo de la arquéspora/célula madre de la megáspora.

La zona calazal puede tener dos o tres células de diámetro, como puede observarse en *Barnadesia arborea* (Fig. 50 D), *B. odorata* (Figs. 51 B, 52 C) y *Chuquiraga ruscifolia* (Fig. 54 B).

Cuando la célula arqueospórica se transforma en célula madre de la megáspora y entra a la profase meiótica, el ápice tegumentario alcanza la región placentaria, se termina de diferenciar la micropila, y se diferencia el endotelio (o tapete tegumentario) a partir de las células de la epidermis ventral del funículo y la epidermis interna del tegumento, cuyas células crecen radialmente y desarrollan un citoplasma denso y núcleos de mayor tamaño, tal como se observó en *Barnadesia odorata* (Figs. 51 D, 52 D), *Doniophyton weddellii* (Fig. 55 C) y *Duseniella patagonica* (Fig. 57, C). El resultado es un endotelio uniseriado de células uninucleadas.

A partir de este estadio, el óvulo crece en sentido axial como se observa en *Barnadesia odorata* (Figs. 51 C, 52 A-B) y *Duseniella patagonica* (Fig. 57 D) y el único tegumento acompaña este crecimiento haciéndose “masivo” o “multiplicativo”. Al mismo tiempo se alarga axialmente el canal micropilar que, en el caso de *B. odorata* ocupa dos tercios de la longitud total del óvulo, mientras que en *Chuquiraga ruscifolia* y *D. patagonica* ocupa la mitad.

A partir del final de la meiosis I, cuando en la etapa de díade, se observó un obturador diferenciado a partir de la epidermis ventral funicular y una hipóstasis que está comenzando a diferenciarse a partir de un conjunto de células ubicadas en el polo calazal a modo de cúpula como se observó para *Chuquiraga ruscifolia* (Fig. 54 C-D) y *Duseniella patagonica* (Fig. 57 D-E).

Al fin de la meiosis II se forma una tétrade lineal de megásporas como se observa en *Barnadesia odorata* (Fig. 52 E). Posteriormente la megaspóra calazal se establece como megaspóra funcional mientras que las tres micropilares degeneran progresivamente como se observa en *Barnadesia odorata* (Figs. 52 F).

Al mismo tiempo, las células del endotelio elongadas radialmente, con sus núcleos ocupando la región superior de las células y la región inferior, en contacto con la megaspóra o saco embrionario, desarrollando engrosamientos parietales “de transferencia” muy pronunciados de composición pecto-celulósica y con vacuolas de sustancias pécticas. Estas características forman parte del fenómeno de “polarización radial de las células del endotelio” que es más acentuado hacia el canal micropilar como se observa en *Barnadesia odorata* (Figs. 52 E-F, 53 A-B) y cuya función es establecer un contacto estrecho con las células sinérgidas del aparato oosférico para especializarse en la transferencia de grandes cantidades de sustancias a corta distancia.

En los estadios sucesivos la megáspóra funcional sufre mitosis sucesivas para formar el saco embrionario o megagametofito. Si bien no pudo observarse el desarrollo del megagametofito en detalle, su estructura final sugiere que es de tipo *Polygonum*. Cuando éste está formado suceden cambios sustanciales en el óvulo: se diferencia una hipóstasis, y la epidermis nucelar se comprime y se consume gradualmente como se observa en *Doniophyton weddellii* (Fig. 56 A-C) y *Duseniella patagonica* (Fig. 58 A-C).

Asociado al crecimiento del megagametofito sucede la reabsorción del endotelio y la desorganización y degradación progresiva del mesofilo del ovario. Sus células, típicamente parenquimáticas, pierden su arreglo apretado perdiendo el contacto entre sí como en *Barnadesia arborea* (Fig. 50 E-F), *B. odorata* (Fig. 53 E), *Chuquiraga ruscifolia* (Fig. 54 E-F), *Doniophyton weddellii* (Fig. 55 A, D), *Duseniella patagonica* (Fig. 57 F) y *Huarpea andina* (Fig. 59 D). En los casos de *D. weddellii* (Fig. 56 E) y *D. patagonica* (Fig. 58 D) se observaron cristales en el mesofilo del ovario.

Posteriormente, el tegumento del óvulo también se ve progresivamente consumido frente al crecimiento del megagametofito que paulatinamente ocupa ese espacio y se nutre de los tejidos esporofíticos que lo rodean.

Cambios esporofíticos	Cambios gametofíticos
- Formación del óvulo, establecimiento del nucelo	-
	<i>Megaesporogénesis</i>
- El óvulo se curva a su posición hemítropa. - Desarrollo del tegumento (inicia la cobertura nucelar)	Establecimiento de la célula arquespórica
- El rudimento seminal se curva a su posición anátropa - El óvulo anátropo se alarga en sentido axial	Célula arquespórica con diferenciación celular premeiótica (PCD) Establecimiento de la célula madre de la megaspóra
- El ápice tegumentario alcanza la región placentaria -Origen del endotelio: epidermis interna del tegumento y epidermis ventral funicular, pasan de isobilaterales a elongadas radialmente -Continuo alargamiento celular radial y engrosamiento de paredes tangenciales de las células próximas al nucelo que se diferenciarán en endotelio -La hipóstasis comienza a diferenciarse	Meiosis I
-Crecimiento radial de las células endoteliales y su proliferación por divisiones anticlinales. -Formación de paredes con espesamientos tipo flange en endotelio en su porción micropilar	Meiosis II
	Megaspóra
	<i>Megagametogénesis</i>
-El mesofilo del ovario comienza a desorganizarse y pierde su arreglo apretado -Epidermis nucelar es reabsorbida -Reabsorción del endotelio en los márgenes del saco embrionario. Sólo persiste en su porción micropilar.	Sucesivas mitosis: megagametofito (saco embrionario) 4-8 nucleado

Tabla 3. Sincronización de eventos del desarrollo entre el óvulo y la megaesporogénesis y megagametogénesis.

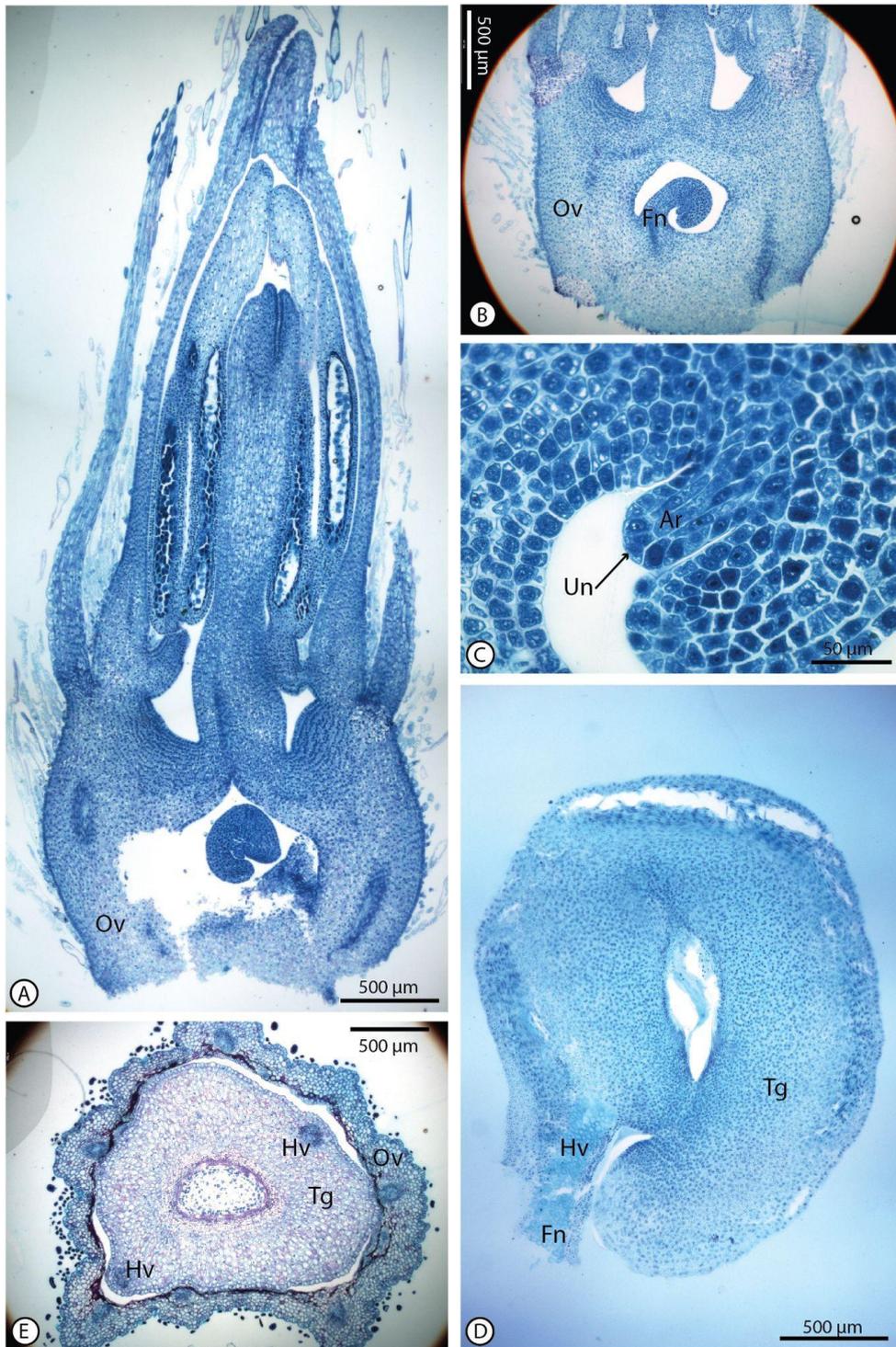


Figura 50 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Barnadesia arborea*. **A.** Vista longitudinal de flor central. **B.** Ovario y óvulo. **C.** Óvulo en posición hemítropa con tegumento asimétrico casi tocando la base funicular. **D.** Nucelo formado por una capa epidérmica, y dos o tres hileras subdepiérmicas. Arquéspora subepidérmica con diferenciación celular premeiótica (DCP). **E.** Corte transversal de ovario, con seis haces vasculares **F.** Óvulo anátropo durante megagametogénesis, nucelo y endotelio reabsorbidos. **Ar:** arquéspora, **Fn:** funículo, **Hv:** haz vascular, **Ov:** ovario, **Tg:** tegumento.

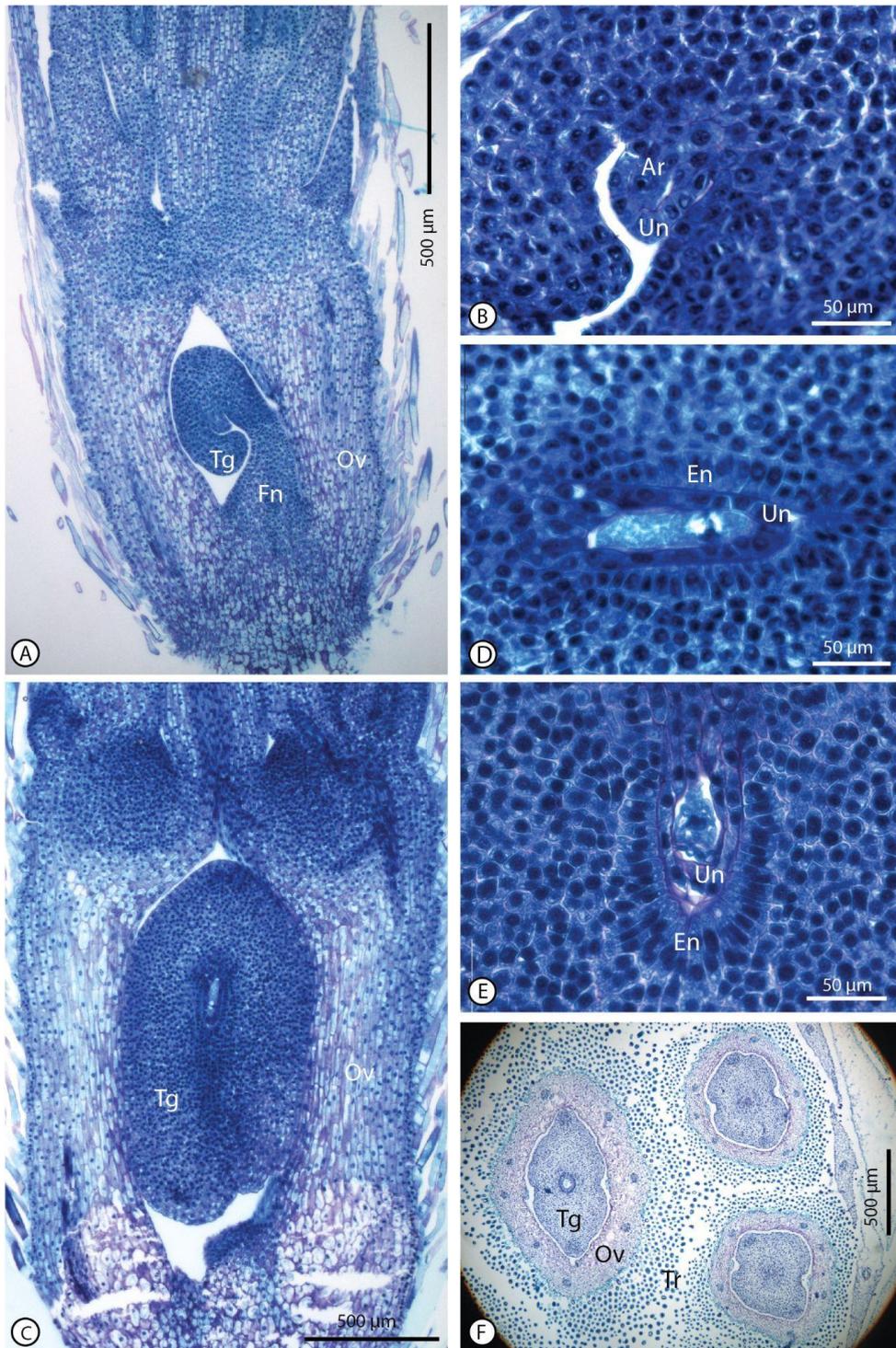


Figura 51 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Barnadesia odorata*. Flor central. A. Corte longitudinal de una flor, óvulo y tegumento bien diferenciados **B.** Detalle del nucelo: Arquéspora subepidérmica con diferenciación celular premeiótica (DCP). **C-D.** Profase I. **C.** Corte longitudinal mostrando el óvulo anátropo elongado en sentido axial. **D.** Célula madre de la megáspora en profase I. Nucelo de una capa y endotelio incipiente. **E.** Megaspora calazal en crecimiento, nucelo degradándose, endotelio polarizado con células alargadas en sentido radial. **F.** Parte de un corte transversal del capítulo: flor central (izquierda) y dos flores marginales (derecha). **Ar:** arquéspora, **Fn:** funículo, **Hv:** haz vascular, **Ov:** ovario, **Tg:** tegumento

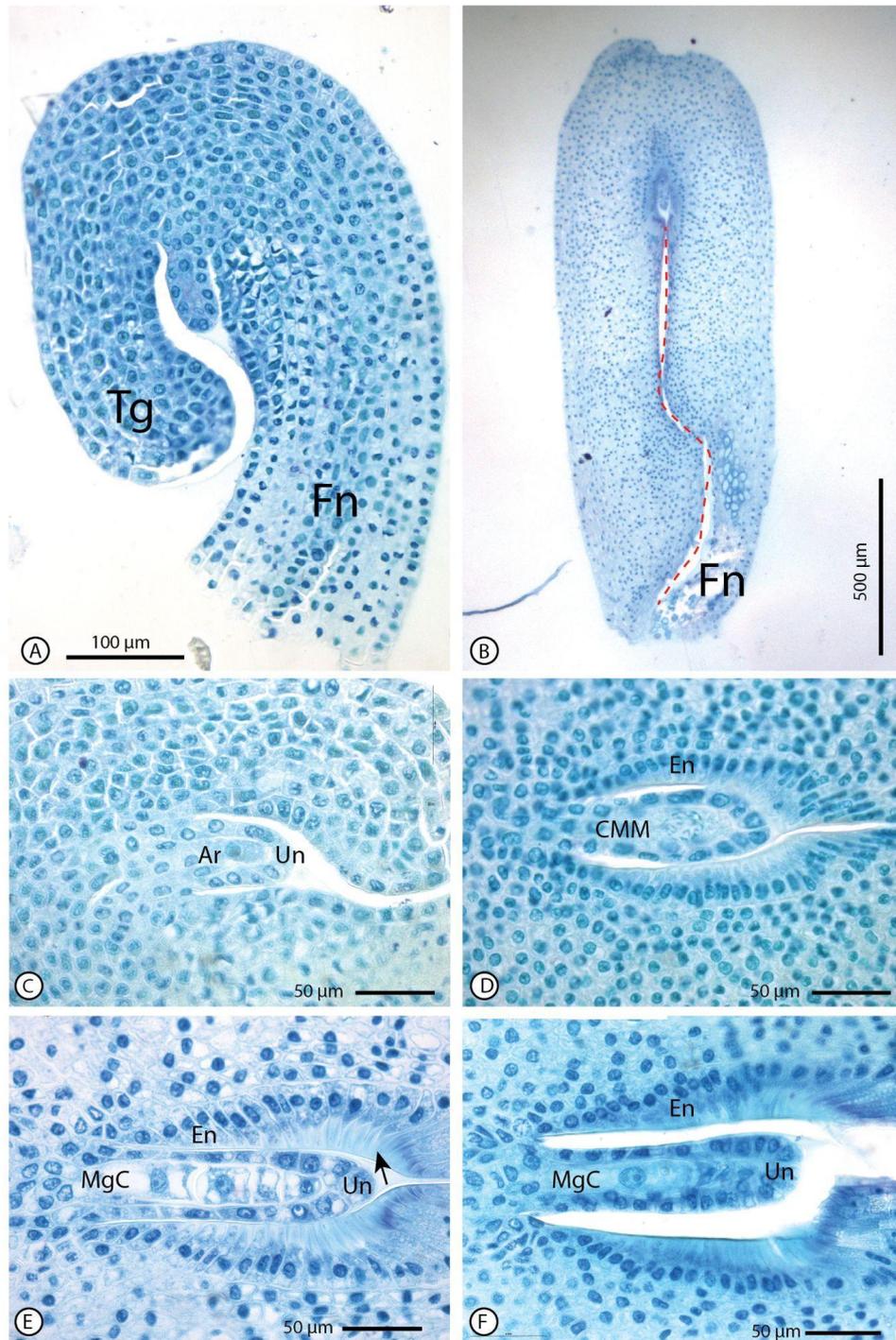


Figura 52 Desarrollo de óvulos de *Barnadesia odorata*. Flor marginal. A. Óvulo curvado (corte sagital), tegumento asimétrico. Establecimiento de la arquéspora. **B.** Óvulo alargado axialmente. Micrópila en línea de puntos. **C.** Nucelo: un estrato epidérmico, y arquéspora subdérmica con diferenciación celular premeiótica (DCP) y dos o tres células calazales. **D.** Profase I: célula madre de la megáspora, endotelio diferenciado, con células alargadas en sentido radial y polarizadas hacia la región micropilar. **E.** Tétrada lineal de megasporas con la megaspora calazal de mayor tamaño, endotelio con engrosamientos de pared primaria (flecha). **F.** Megasporas micropilares degenerando. **Ar:** arquéspora, **CMM:** célula madre de la megaspora, **En:** endotelio, **Fn:** funículo, **MgC:** megaspora calazal, **Ov:** ovario, **Tg:** tegumento, **Un:** nucelo.

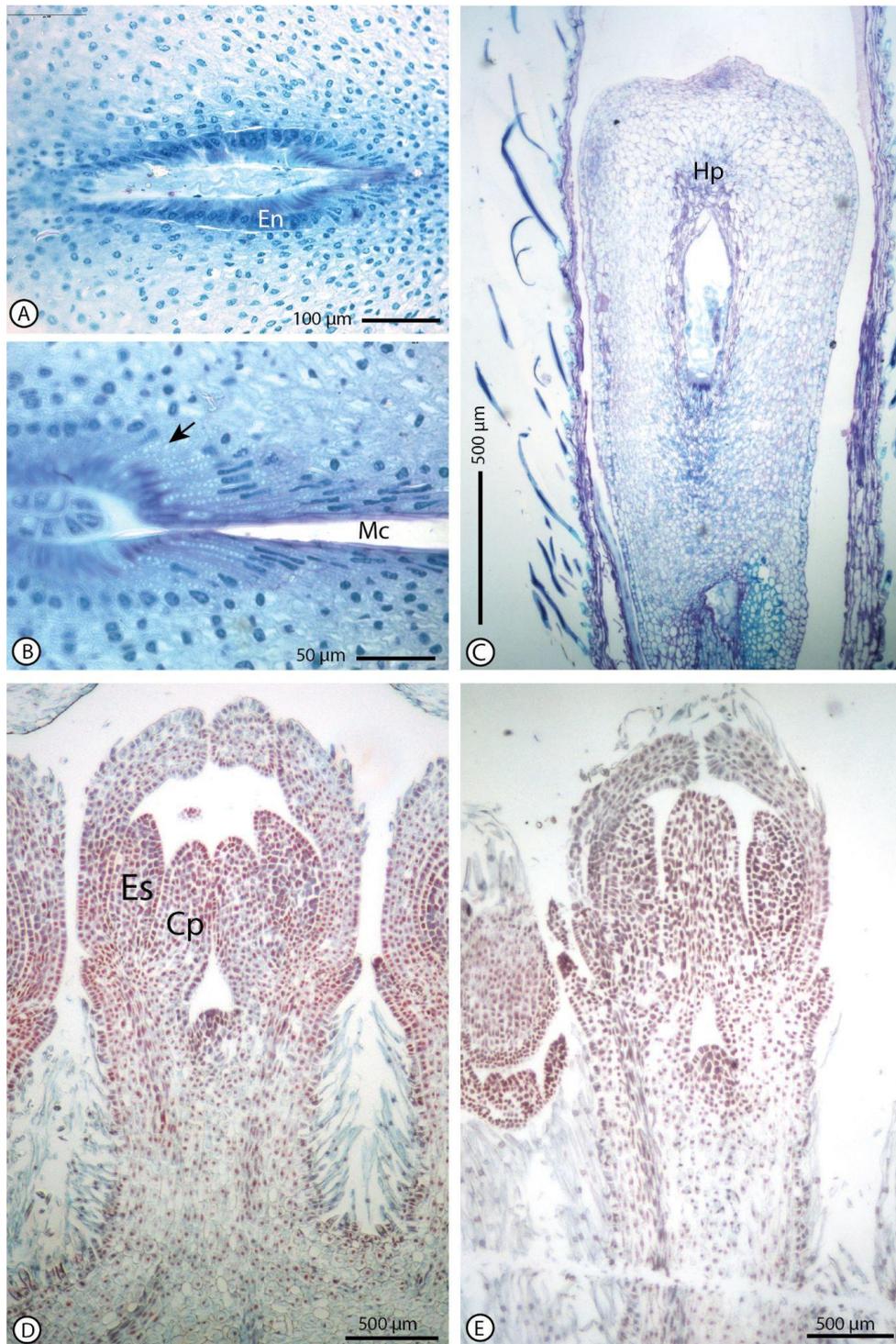


Figura 53 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Barnadesia odorata* (flor marginal) y desarrollo de óvulos de *Chuquiraga ruscifolia*. **A.** Megagametofito diferenciado, endotelio con engrosamientos de las paredes y nucelo consumido. **B.** Endotelio de región micropilar con vacuolas de contenido péctico (flecha). **C.** Post fecundación, endotelio reabsorbido, sólo persiste en la región micropilar, hipóstasis desarrollada, pared del ovario muy reducida. *Chuquiraga ruscifolia*. **D-E.** Origen del óvulo : células meristemáticas en forma de domo en la base del ovario. **Cp:** carpelos, **En:** endotelio, **Es:** estambres, **Hp:** hipóstasis, **Mc:** micrópila.

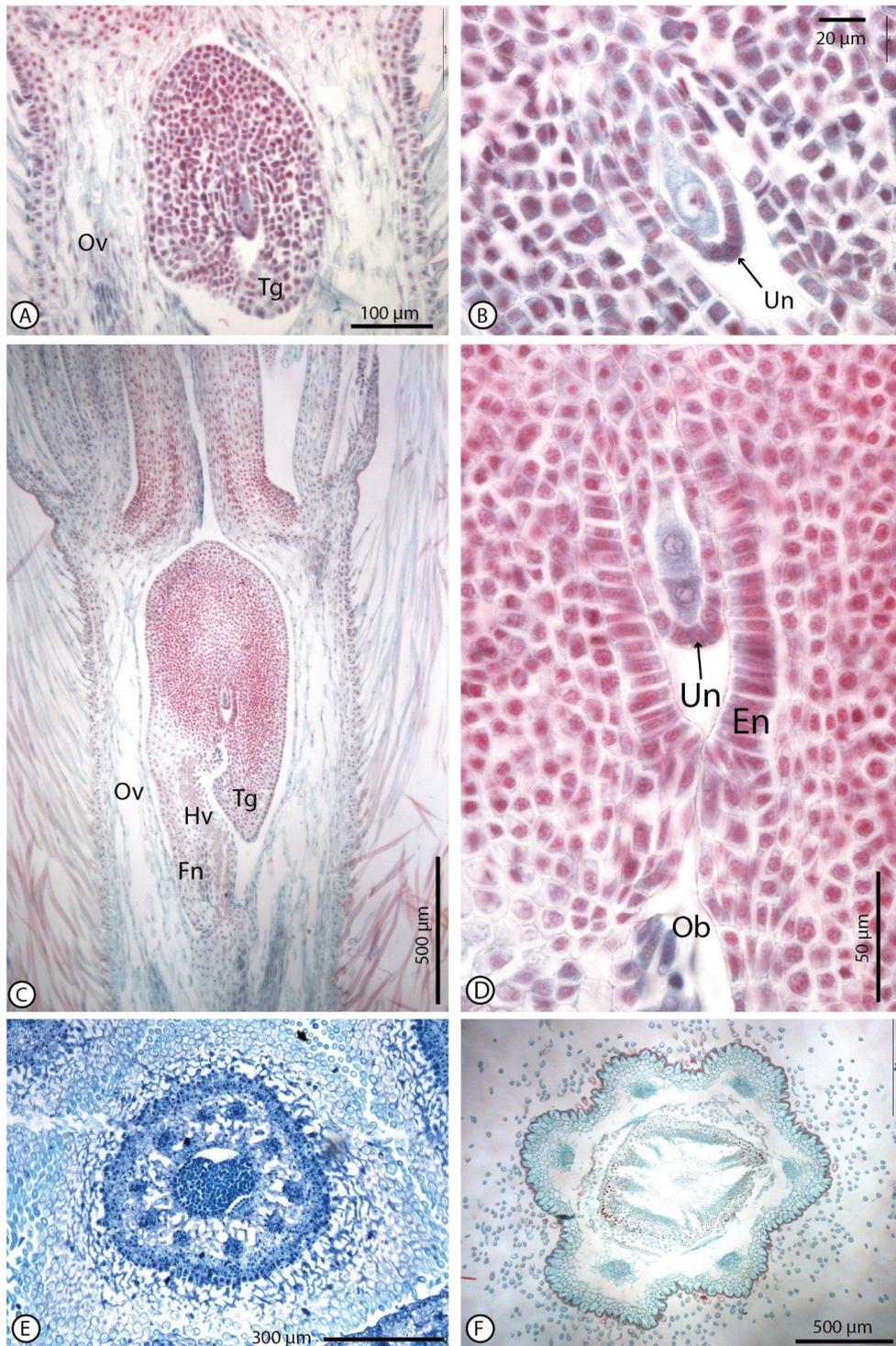


Figura 54 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Chuquiraga ruscifolia*. **A.** Óvulo anátropo (corte sagital) con arquéspora diferenciada. **B.** Nucelo: una capa epidérmica,, arquéspora subdérmica con diferenciación celular premeiótica (DCP) y algunas células subdérmicas en el extremo calazal. **C.** Rudimento seminal alargado axialmente, comienzo de formación de la hipóstasis, mesofilo de la pared del ovario en desorganización. **D.** Díada, endotelio desarrollado, estructuras funiculares (obturador) diferenciadas en extremo micropilar. **E-F.** Corte transversal de ovario. **E.** Pared del ovario con 10 haces vasculares en extremo micropilar. **F.** Etapa posterior a la fecundación. Obsérvese el mesofilo de la pared del ovario consumido y con seis haces vasculares. **En:** endotelio, **Fn:** funículo, **Hv:** haz vascular, **Ob:** obturador, **Ov:** ovario, **Tg:** tegumento, **Un:** nucelo.

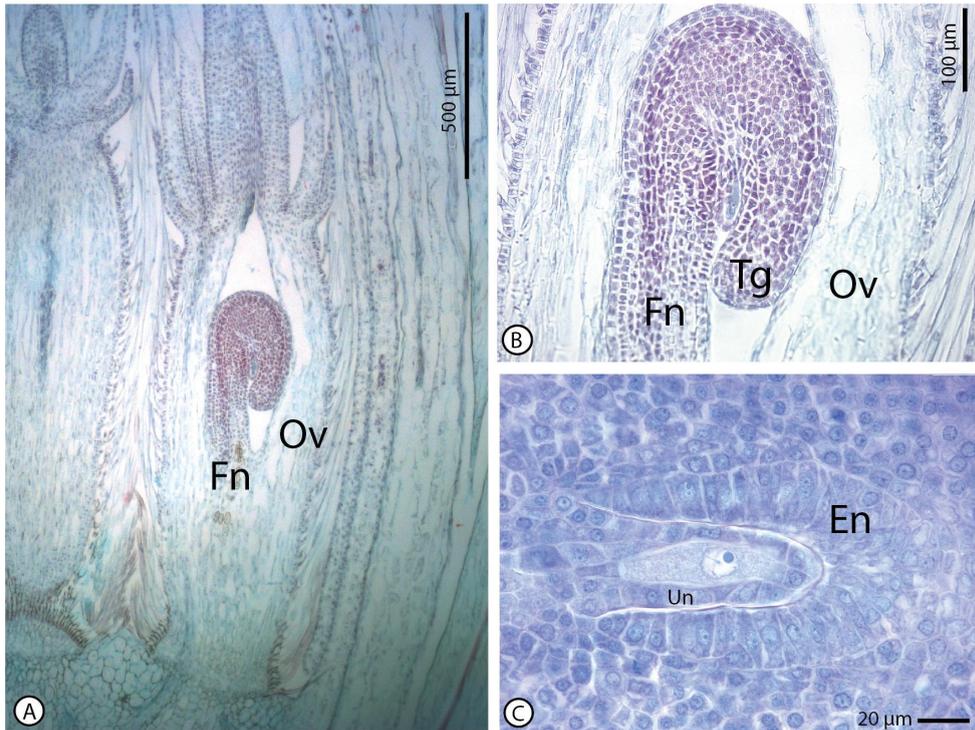


Figura 55 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Doniophyton weddellii*. **A.** Óvulo y ovario. **B.** Óvulo anátropo (corte sagital) con tegumento asimétrico. **C.** Nucelo: Célula madre de la megáspora en profase I, una capa epidérmica, y algunas células subepidérmicas en el extremo calazal, comienzo de la diferenciación del endotelio temprano sin engrosamientos en sus paredes. **En:** endotelio, **Fn:** funículo, **Hv:** haz vascular, **Ov:** ovario, **Tg:** tegumento, **Un:** nucelo

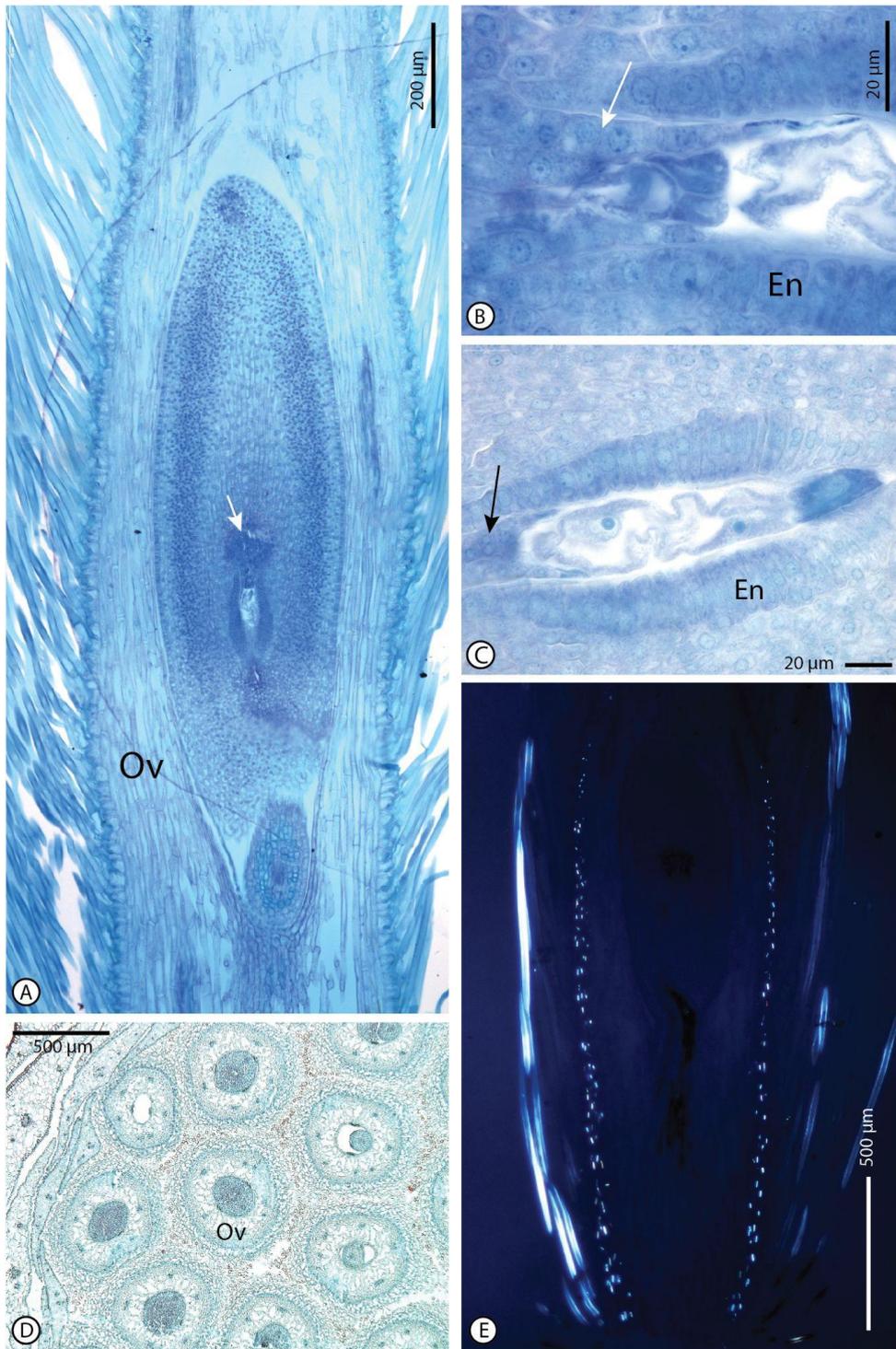


Figura 56 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Doniophyton weddellii*. **A.** Ovario y óvulo con hipóstasis desarrollado (flecha). **B.** Megagametofito: tres células antipodales y algunas células remanentes del nucelo en el extremo calazal (flecha). **C.** Célula central binucleada del megagametofito, células remanentes del nucelo en el extremo calazal (flecha), endotelio desarrollado. **D.** Vista transversal de capítulo completo al nivel del ovario de las flores. Flores con pared de ovario en desorganización con cinco haces vasculares. **E.** Fotografía con luz polarizada, mostrando cristales en el parénquima del ovario durante la etapa de saco embrionario 8 nucleado. **En:** endotelio, **Ov:** ovario.

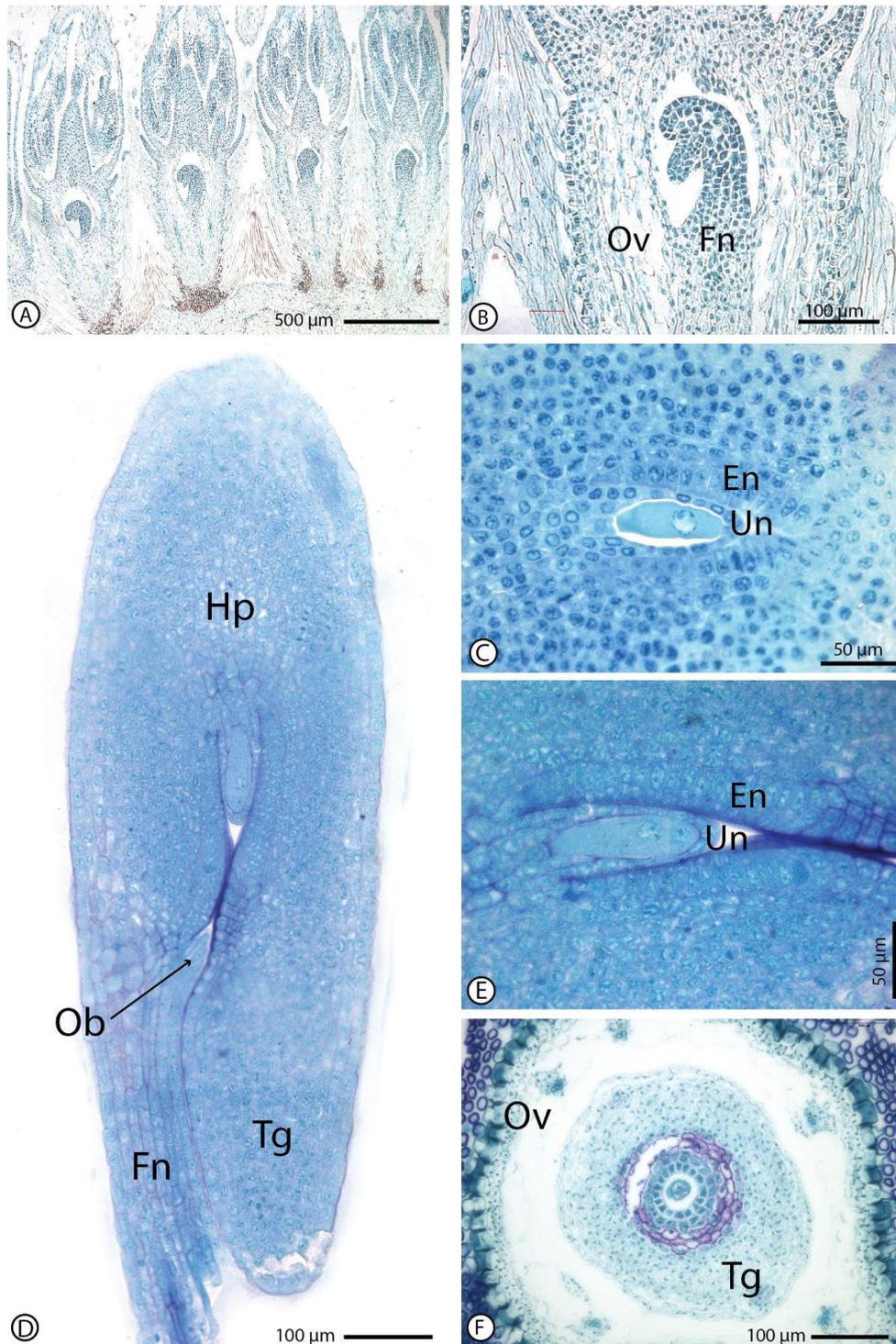


Figura 57 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Dusenella patagonica* **A.** Corte longitudinal de capítulo completo mostrando flores con óvulos en formación. **B.** Óvulo curvándose y tegumento iniciado. **C.** Nucelo: una capa epidérmica, célula madre de la megáspora subepidérmica en profase I, algunas células subdérmicas en el extremo calazal y endotelio diferenciado. **D.** Óvulo alargado axialmente, estructuras funiculares desarrolladas (obturador), comienzo de la formación de la hipóstasis. **E.** Díade, con la calazal de tamaño considerablemente mayor, endotelio desarrollando engrosamientos en sus paredes. **F.** Vista transversal de ovario y óvulo, luego de la fecundación parénquima del ovario completamente consumido con cinco haces vasculares. **En:** endotelio, **Fn:** funículo, **Hp:** hipóstasis, **Ob:** obturador, **Ov:** ovario, **Tg:** tegumento, **Un:** nucelo.

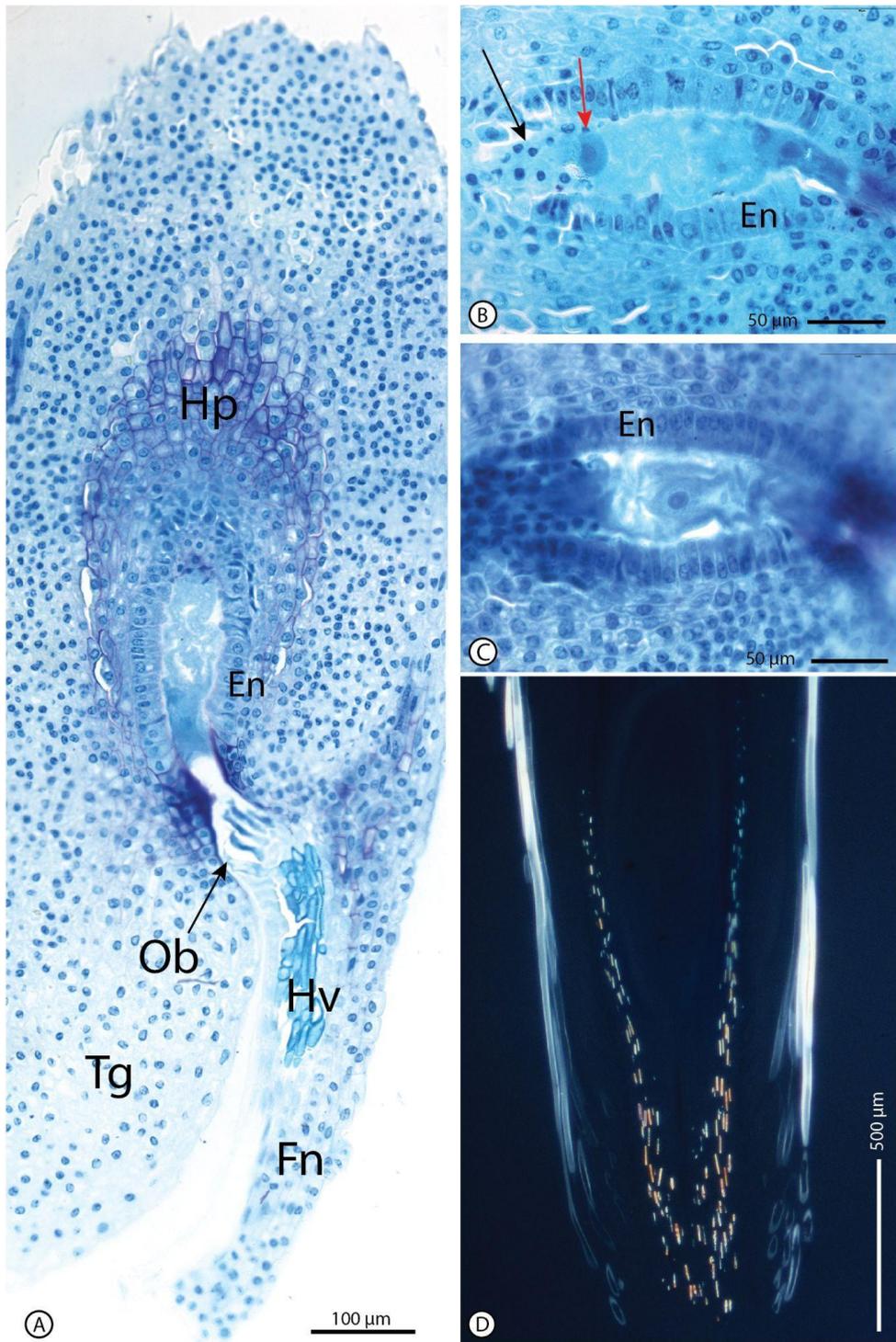


Figura 58 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Dusenella patagonica*. **A.** Corte sagital de óvulo. Saco embrionario desarrollado, hipóstasis, endotelio y estructuras funiculares desarrollados. **B.** Saco embrionario. antipodal (izquierda), célula media (centro) y aparato oosférico (derecha) introducido en el canal de la micropila. **C.** Núcleo de la célula central. **D.** Fotografía con luz polarizada, mostrando cristales en el mesofilo del ovario. En: endotelio, Fn: funiculo, Hp: hipóstasis, Ob: obturador, Tg: tegumento.

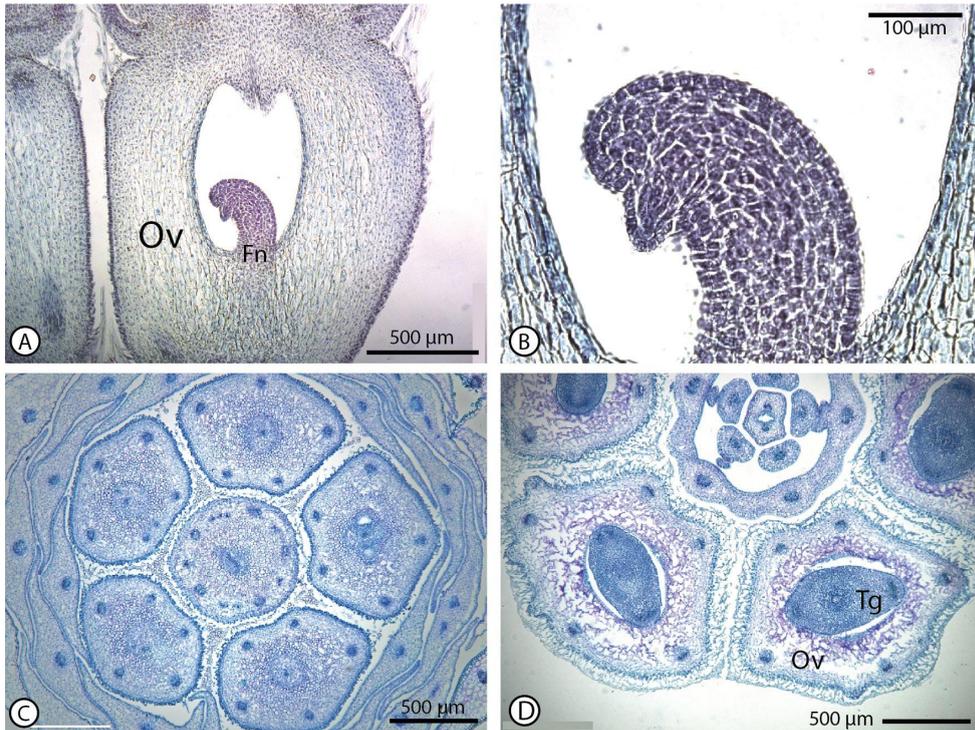


Figura 59 Desarrollo de ovarios y óvulos de *Huarpea andina*. **A.** Corte longitudinal de una flor del radio con óvulo incipiente. **B.** Óvulo curvándose, tegumento iniciado. **C-D.** Corte transversal de inflorescencia completa mostrando cinco haces vasculares en el mesofilo del ovario tanto de la flor del disco (C) como del disco y del radio (D).

4.3.2 Semillas

Se estudiaron las semillas de *Barnadesia polyacantha*, y las semillas y sustancias de reserva de *Chuquiraga erinaceae*, *Doniophyton weddellii* y *Duseniella patagonica*.

Respecto a los análisis de semillas, los embriones observados son cotiledonares, axiales continuos de tipo espatulado, y consisten en un eje hipocótilo-radícula y dos cotiledones como puede observarse en *Barnadesia polyacantha* (Fig. 60 A-B), *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 A, C, F), *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 A-B) y *Duseniella patagonica* (Fig. 66 A-B). Los cotiledones son plano-convexos y yuxtapuestos y alcanzan las tres cuartas partes, en *Barnadesia polyacantha* (Fig. 60 A), y un tercio, en *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 A), de la longitud total del embrión. Ambos ápices meristemáticos, el radicular y el apical están bien diferenciados.

El meristema apical del tallo (SAM) puede presentar forma de domo típico como lo ilustra *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 A, flecha) o no, como en *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 B, flecha), pero siempre se diferencia porque sus células tienen un citoplasma muy denso. En el meristema subapical de la raíz (RAM) pueden observarse las tres zonas principales: caliptra, centro quiescente o células centrales y estela, que incluye el procambium y periciclo en *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 C).

El mesófilo del cotiledón es dorsiventral con las células de la cara adaxial en empalizada y las de la cara abaxial isodiamétricas. Ambas regiones están demarcadas por los tejidos vasculares o procámbium y externamente por la protodermis como se muestra en *Barnadesia polyacantha* (Fig. 60 B, D), *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 D-E), *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 B) y *Duseniella patagonica* (Fig. 65 A-B).

Respecto a la constitución de la pared de la cipsela se encuentra un pericarpo liso (sin costillas) considerablemente reducido y de células sin contenido en *Barnadesia polyacantha* (Fig. 60 A, C-E), *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 A, F-G), *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 A-C), y *Duseniella patagonica* (Fig. 65 A-C).

La pared del fruto está formada por la epidermis del ovario, de células de paredes gruesas, cutinizadas y cubiertas de tricomas barnadesioides (3-celulares, formados por una célula elongada, una basal isodiamétrica y una epidérmica en la base), más unas pocas capas celulares subepidérmicas colapsadas y degradadas.

La pared del fruto se engruesa hacia la base en *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 C) y *Duseniella patagonica* (Fig. 65 C). Puede presentar una capa subyacente de células con grandes engrosamientos en las paredes anticlinales (esclereidas?) como en *Barnadesia polyacantha* (Fig. 60 C). El límite interno de la pared del fruto está delimitado por los restos de los haces vasculares de la pared del ovario que en corte transversal pudieron identificarse entre 7 y 10 entre en *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 B).

A continuación y hacia adentro se observan estratos celulares más o menos degradados, correspondientes al tegumento seminal (derivado del tegumento masivo del óvulo). En estas capas se presentan canales lisígenos en *Duseniella patagonica* (Fig. 65 A, flechas) o cristales en *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 E). En *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 C) y *Duseniella patagonica* se encuentran 4 a 6 capas de células almacenando abundantes granos de almidón en el caso de *D. patagonica* (Figs. 65 C, 66 A). También, en este taxón se observan 2-3 capas de células sin contenido (con uniones celulares lobuladas) y con una película de material denso o sustancias impregnantes en la base, probablemente material péctico (que se muestran muy positivas a la prueba para polisacáridos totales PAS y que tiñe de color violeta oscuro con la prueba de Azul de Toluidina) (Fig. 66 B, flechas).

Cuando la compactación está muy avanzada se observa una capa acelular homogénea y el conjunto se presenta como una película de restos celulares como en *Barnadesia polyacantha* (Fig. 60 C, E), *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 61 G), *Doniophyton weddellii* (Fig. 63 B-C), y *Duseniella patagonica* (Fig. 65 C).

Por lo tanto, la siguiente capa interna, generalmente de un estrato celular de espesor, corresponde a un remanente del endosperma. En todas las especies estudiadas el endosperma es escaso, usualmente de una o dos capas de espesor con alguna división periclinal ocasional como en *Duseniella patagonica* (Fig. 66 A). Por último, se observan las estructuras del embrión.

Los embriones acumulan reservas en los cotiledones, por lo que las semillas son exendospermadas. Mostraron proteínas como sustancia de reserva principal ubicados en cuerpos proteicos con unas pocas inclusiones globoides, entre 1-2 por cuerpo proteico en *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 62 A) y *Duseniella patagonica* (Fig. 66 C-D) o con una inclusión globoide ocupando casi todo el espacio en *Doniophyton weddellii* (Fig. 64 A, C) y cristales proteicos pequeños (Fig. 64 B-C).

Como reserva secundaria se encontraron lípidos como gotículas lipídicas en la periferia de las células en *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 62 B) y ubicados en cuerpos lipídicos de menor tamaño rodeando los cuerpos proteicos principales en *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 62 C-E), *Doniophyton weddellii* (Fig. 64 D) y *Duseniella patagonica* (Fig. 66 D). También, se identificaron las membranas de cuerpos lipídicos menores rodeando los cuerpos proteicos principales en *Duseniella patagonica* (Fig. 66 D) y las pruebas para lípidos revelaron la presencia de gotículas lipídicas dispersas probablemente formadas durante el seccionamiento del material en la misma especie (Fig. 66 E, F).

No se observó almidón como reserva pero sí muy escasos granos de almidón con cruz de malta en *Barnadesia polyacantha* (Fig. 60 D) y *Chuquiraga erinaceae* (Fig. 62 F).

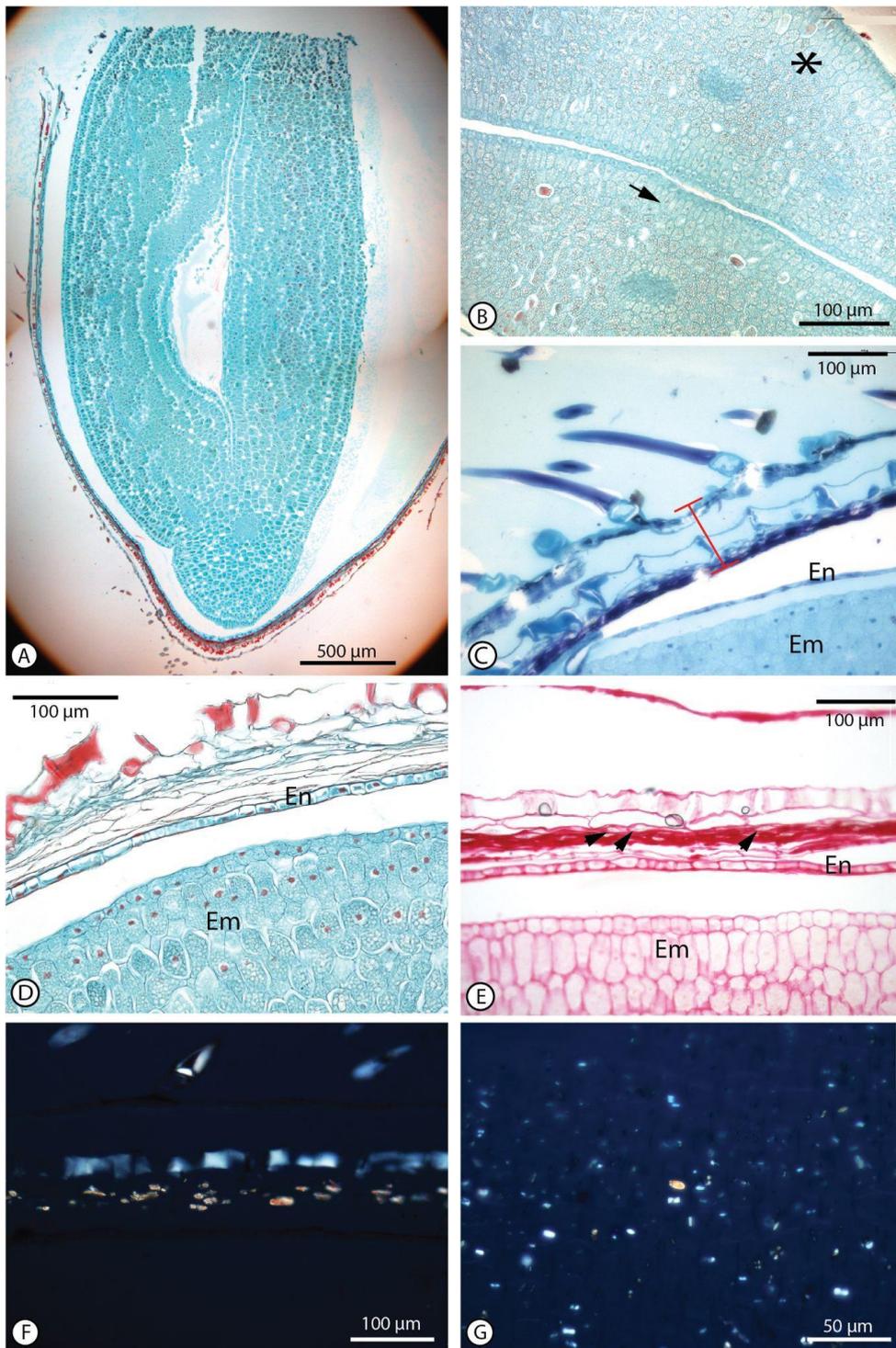


Figura 60. Anatomía de embrión y pared del fruto de *Barnadesia polyacantha*. **A.** Embrión con dos cotiledones y pericarpio muy reducido. **B.** Cotiledones del embrión indicando mesofilo abaxial (asterisco) y adaxial (flecha). **C.** Pericarpio reducido, una capa de endosperma. **D.** Pared del fruto de hasta seis capas. **E.** Capa compactada con cristales en algunos espacios esquizógenos (flechas). **F-G.** Fotografías con luz polarizada. **F.** Cristales en pared del fruto. **G.** Granos de almidón en mesofilo cotiledonar. **Em:** embrión. **En:** endosperma.

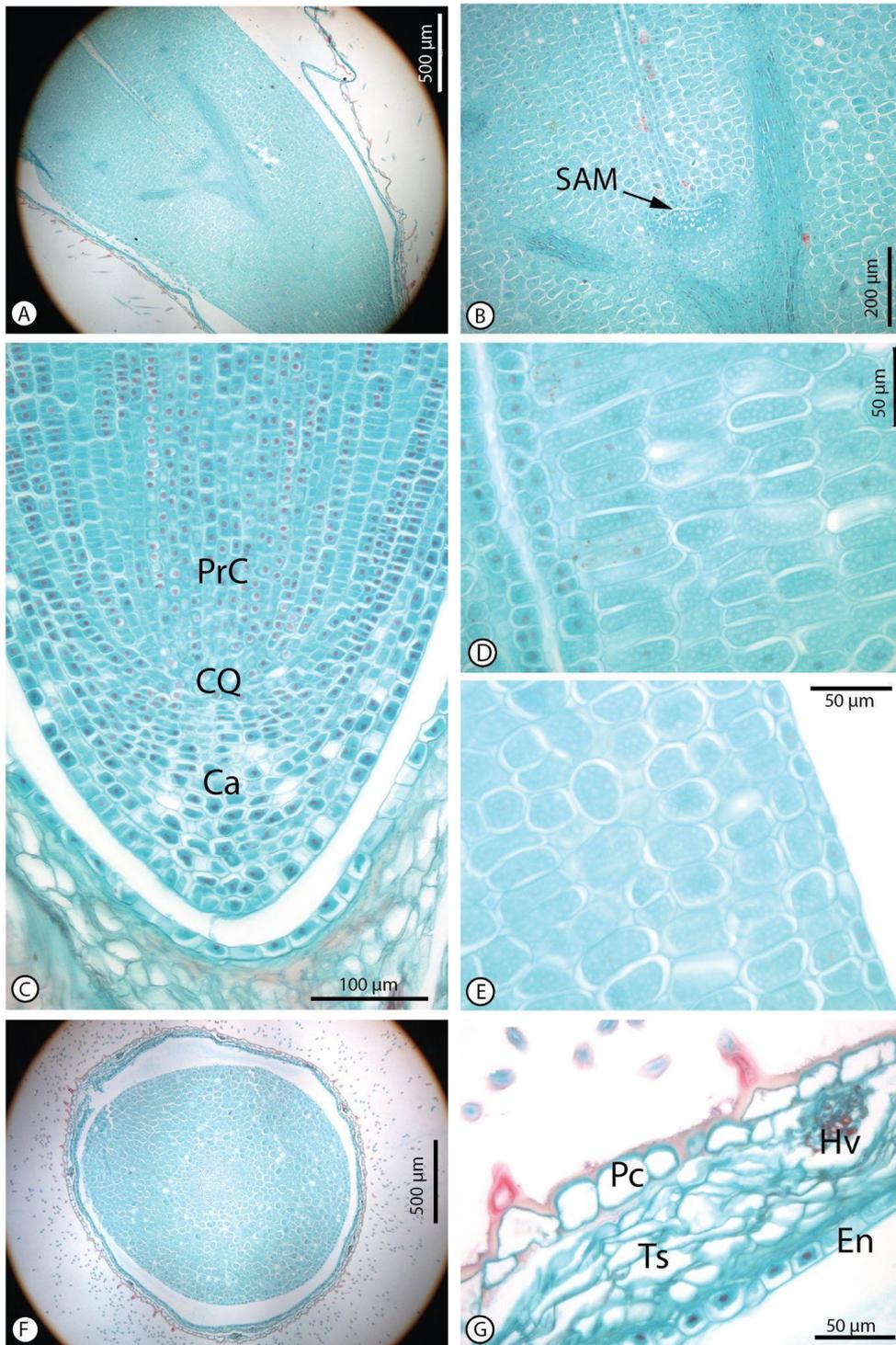


Figura 61. Anatomía del embrión y pared del fruto de *Chuquiraga erinaceae*. **A.** Embrión con cotiledones y pericarpio muy reducido. **B.** Ápice meristemático del eje. **C.** Ápice meristemático de la raíz con procambium, centro quiescente y caliptra, tegumento más conservado en la zona de la radícula. **D.** Mesofilo adaxial del cotiledón con células en empalizada. **E.** Mesófilo abaxial con células isodiamétricas. **F.** Corte transversal de la semilla por debajo de los cotiledones, pericarpio muy reducido con 7 haces vasculares. **G.** Pericarpio y tegumento compactado de 6-7 capas de espesor, y una única capa de endosperma. **Ca:** caliptra, **CQ:** centro quiescente, **En:** endosperma, **Hv:** haz vascular, **Pc:** pericarpio, **PrC:** procámbium, **SAM:** ápice meristemático del eje, **Ts:** tegumento seminal.

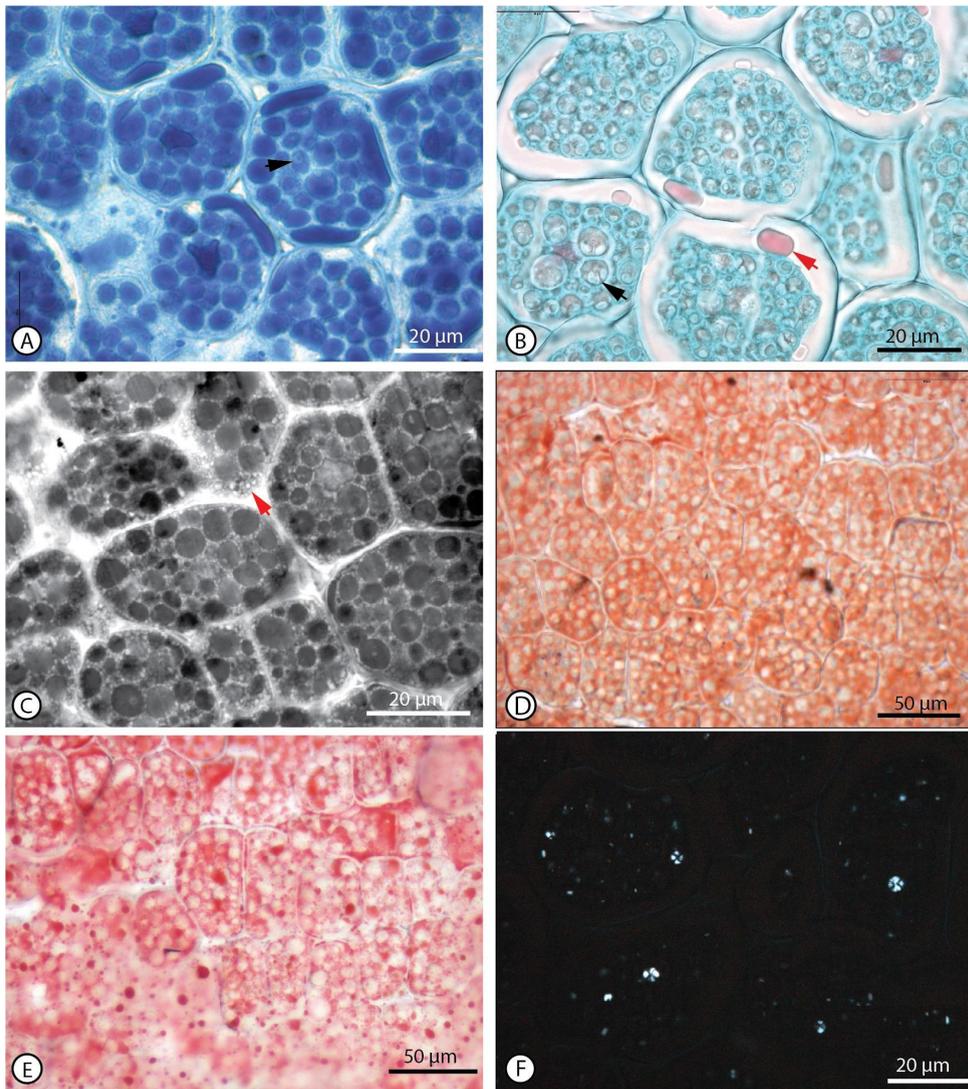


Figura 62. Sustancias de reserva de embrión de *Chuquiraga erinaceae*. A-B. Proteínas. A. Cuerpo proteico con un cuerpo globoide en su interior (flecha) (Azul de Comassie). **B.** Cuerpo proteico con dos cuerpos globoides (flecha negra), gotícula lipídica (flecha roja) (Safranina-Fast Green). **C-E: Lípidos. C.** Cuerpos lipídicos pequeños (flecha roja) rodeando los cuerpos proteicos (Sudán black). **D.** Cuerpos lipídicos (Sudán III). **E.** Cuerpos lipídicos y gotículas lipídicas. (Sudán IV). **F.** Fotografía con luz polarizada. Granos de almidón con Cruz de Malta.

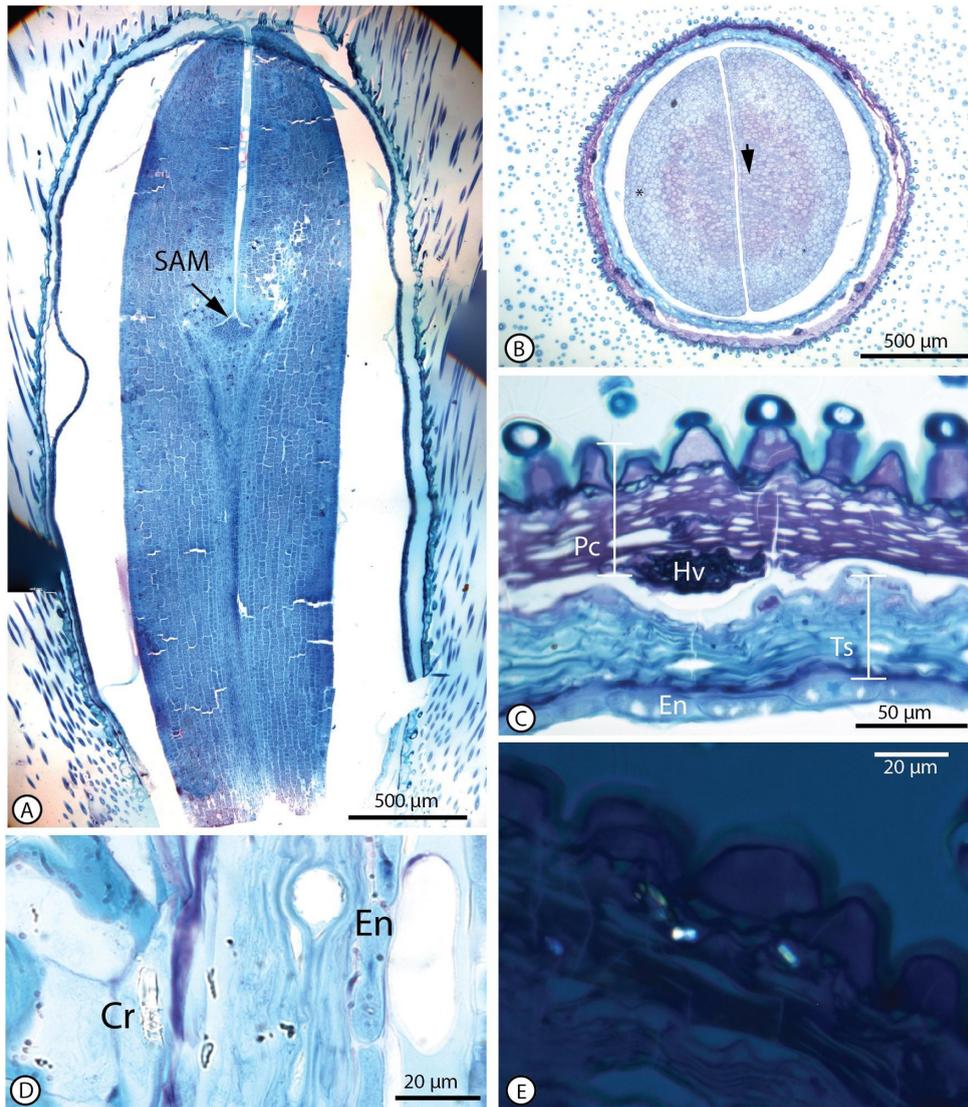


Figura 63. Anatomía de embrión y pared del fruto de *Doniophyton weddellii*. A. Cotiledones y ápice meristemático del eje (flecha). B. Cotiledones con mesofilo adaxial (flecha) y mesofilo abaxial (asterisco). C. Pericarpio y tegumento muy compactados, y una única capa de endosperma. D. Cristal en el tegumento y célula de endosperma. E. Fotografía con luz polarizada, cristales en el tegumento. Cr: cristal. En: endosperma, Hv: haz vascular, Pc: pericarpio, SAM: ápice meristemático del eje, Ts: tegumento seminal.

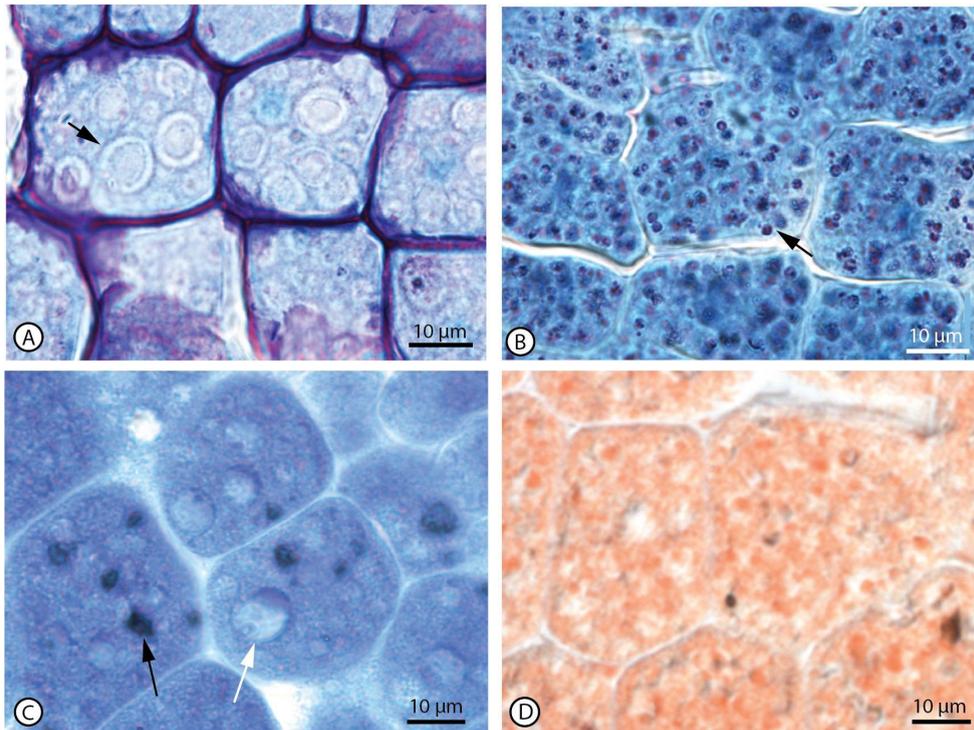


Figura 64. Sustancias de reserva de embrión de *Doniophyton weddellii*. A-C Proteínas. A. Cuerpos proteicos con un cuerpo globoide (flecha) (Azul de Toluidina). **B.** Cristales proteicos (flecha) (Azul de Comassie). **C.** Cuerpos proteicos con cuerpo globoide (flecha blanca) y cristales proteicos (flecha negra) (Azul de Comassie). **D. Lípidos.** Cuerpos lipídicos rodeando los cuerpos proteicos (Sudán III).

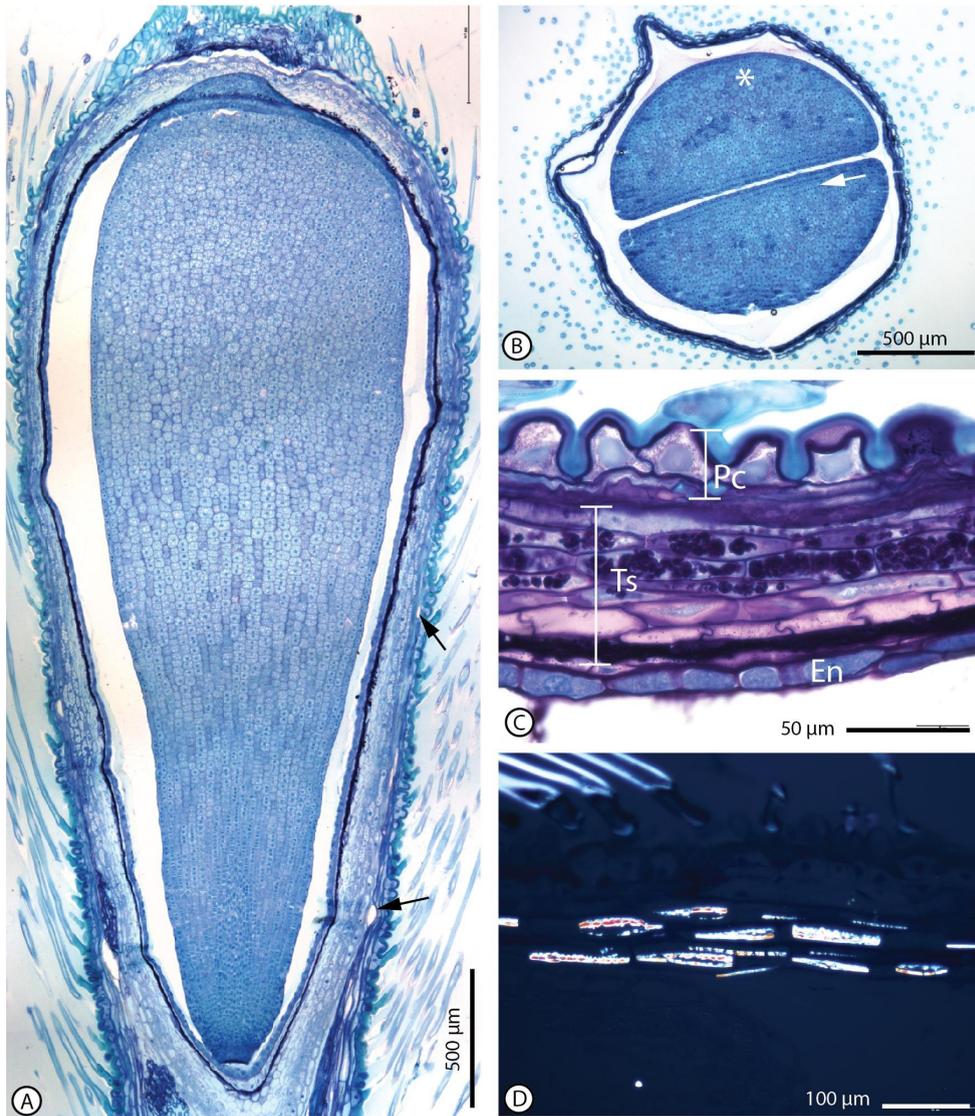


Figura 65. Anatomía de embrión y pared del fruto de *Dusenilla patagonica*. **A.** Embrión, pericarpio y tegumento seminal con canales lisígenos (flechas). **B.** Corte transversal a la altura de los cotiledones, pericarpio muy reducido. Cotiledones con mesofilo adaxial (flecha) y mesofilo abaxial (asterisco). **C.** Pericarpio y tegumento seminal con granos de almidón y capa pigmentada (flecha). Endosperma de una capa. **D.** Fotografía con luz polarizada. Cristales en el tegumento seminal. **En:** endosperma, **Pc:** pericarpio, **Ts:** tegumento seminal.

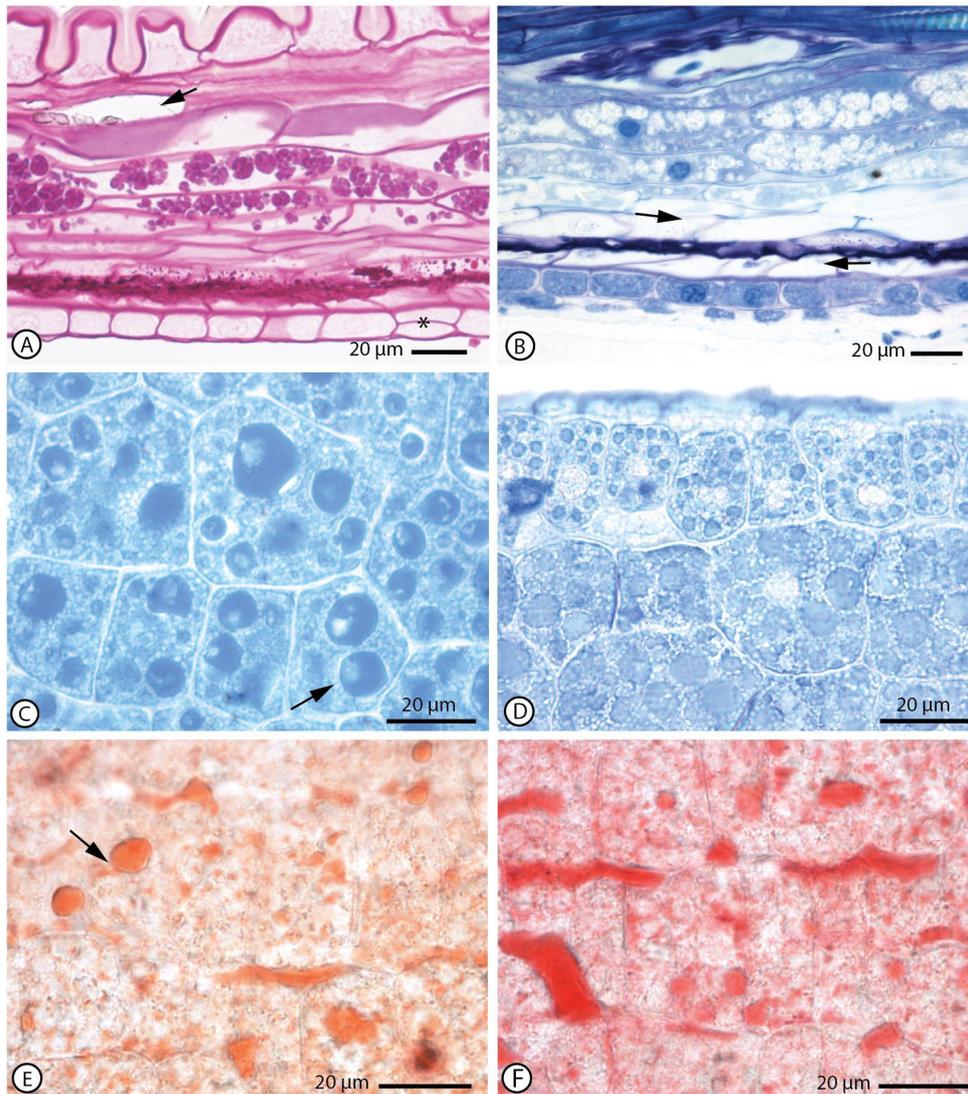


Figura 66. Pared del fruto y sustancias de reserva de *Dusenilla patagonica*. **A.** Pericarpo con cristal en el canal lisígeno (flecha), endosperma de una capa con una célula en división periclinal (asterisco), granos de almidón en el tegumento seminal y película de restos orgánicos (Tinción PAS) **B.** Pericarpo con película de sustancias pécticas en el tegumento seminal (flechas) y endosperma de dos capas (Azul de toluidina). **C-D Proteínas.** **C.** Cuerpos proteicos con inclusiones globoides (flecha) (Azul de Comassie). **D.** Cuerpos proteicos rodeados de cuerpos lipídicos mas pequeños (Azul de Bromofenol). **E-F Lípidos.** **E.** Gotículas lipídicas. (Sudán III). **F.** Gotículas lipídicas. (Sudán IV).

4.4 Resumen de Resultados

Desarrollo de flores e inflorescencias

Con respecto al desarrollo de inflorescencias y flores se encontraron meristemas planos y convexos tanto en capítulos radiados como discoideos y disciformes. El meristema zonado se observó para una especie de capítulos radiados, *Barnadesia odorata*. Los primordios comunes marginales fueron observados en capítulos radiados y discoideos. Se observaron tres tipos de primordios: en *Schlechtendalia luzulifolia* hemisféricos, triangulares y poligonales; y en *Dusenilla patagonica* hemisféricos y poligonales. La mayoría de especies analizadas mostraron zonas de receptáculo libre en el ápice hacia el fin de la iniciación y una disposición caótica de primordios. Se describió por primera vez la presencia de flor terminal en *Chuquiraga erinacea* y *C. avellanadae*, la cual se distingue por el mayor tamaño. La progresión del fraccionamiento del meristema de la inflorescencia resultó ser simultánea y centripeta mientras que la progresión de la organogénesis en el capítulo sucedió en forma simultánea, centripeta, centripeta con atraso en las flores del radio o centrífuga. Durante la organogénesis el orden de diferenciación de los verticilos fué variado, C-A-K o C-K-A, tanto para las especies de capítulos discoideos como en los dos tipos de flores de un mismo capítulo radiado. En las flores del radio unisexuales femeninas, se comprobó que la unisexualidad es por: ausencia completa de estambres o desarrollo de estambres y posterior aborto de los mismos. Con respecto al desarrollo de la corola, en todos los taxones se encontró que los lóbulos de la corola se desarrollan simultáneamente a partir de un anillo meristemático expresado en la etapa de embudo o *funnel*. La iniciación del papus en todas las especies resultó ser integral con la organogénesis y secuencial, surgiendo un ciclo de tres o cinco cerdas en posición alternipétala, seguido por otra ciclo con las cerdas intermedias. El momento de inicio de desarrollo de los indumentos en ovario, corola y receptáculo fué variado restringiéndose a la transición organogénesis-crecimiento zonal.

Capítulo	Especies	Progresión del fraccionamiento del meristema	Progresión de la organogénesis en el capítulo	Orden de diferenciación de los órganos
Discoideo Homógamo	<i>Arnaldoa macbrideana</i>	-	-	C-K-A
	<i>Chuquiraga avellanadae</i>	Simultánea	Simultánea	
	<i>Chuquiraga erinacea</i>	Centripeta	-	-
	<i>Chuquiraga ruscifolia</i>	-	Centripeta	C-A-K

	<i>Chuquiraga ulicina</i>	-	Centrípeta	
	<i>Schlechtendalia luzulifolia</i>	Centrípeta	Centrípeta	
<i>Disciforme Heterógamo</i>	<i>Duseniella patagonica</i>	Centrípeta	Centrípeta con atraso en las flores del radio	C-A-K (disco) C-K (radio)
<i>Radiado Homógamos</i>	<i>Barnadesia odorata</i>	Simultánea	Centrípeta con atraso en las flores del radio (o centrífuga, ya que hay sólo una serie de flores del disco)	C-K-A (disco) C-A-K (radio)

Tabla 4. Progresión del fraccionamiento del meristema y de la organogénesis para el capítulo.

Esporangiógenesis, microsporogénesis y microgametogénesis

Las anteras son biesporangiadas y tetraloculares. Las células iniciales subepidérmicas se presentan como una capa de una célula de espesor y seis a ocho células de extensión que por divisiones periclinales originarán las arqueósporas, el tapete, la capa media y el endotecio respectivamente, por lo que la pared de la antera en su estado maduro se clasifica como de tipo "Dicotiledóneo". Las arqueósporas muestran diferenciación celular premeiótica (DCP) antes de la segregación final de las cuatro capas del microesporangio y sufren sucesivas mitosis hasta diferenciarse en células madre de las microsporas. El gradiente de DCP se extiende a células del tapete. La meiosis es simultánea y da como resultado tétradas tetrahédricas de microsporas. El tapete se muestra binucleado en varias etapas del desarrollo y puede ser periplasmodial o secretor (con cuerpos de Ubisch) degenerando en el estado de microspora vacuolada o posteriormente. El tapete puede tener más de una capa de células de espesor en la zona adyacente al tejido conectivo. La capa media es efímera y degenera en el estado de microspora vacuolada. El depósito de la esporodermis comienza luego de la meiosis con la aparición de la primexina, de composición polisacarídica y proteica. Cuando las microsporas se liberan la endexina ya está desarrollada y es de composición esporopolenínica con presencia ocasional de carbohidratos y/o proteínas. La ectexina comienza a reemplazar a la primexina hasta que se completa su depósito, llegando a estar ya bien desarrollada hacia el estado de microspora vacuolada. La intina es la última capa en diferenciarse y debido a su escaso grosor no es distinguible hasta el final del desarrollo y está compuesta de polisacáridos y proteínas. En cuanto a las características generales del grano de polen, los resultados coinciden con lo

publicado hasta el momento. Los granos de polen son tricolporados, lofados o no lofados, y pueden presentar depresiones intercolpares. La ectexina es mono, bi o tricapa y algunas especies presentan cáveas entre las capas de exina. Los granos de polen se dispersan en estado bi o tricelular. En las zonas de los colporos se desarrolla un patrón trilaminar que consta de intina engrosada, endexina engrosada y un tapón de sustancias pécticas y proteicas.

Se encontraron, al momento de la dehiscencia, granos de polen *starchy* con granos de almidón escasos, abundantes o abundantes con cruz de malta desarrollada y granos de polen *starchless* sin granos de almidón al momento de la antesis. El tapete se mostró positivo para los análisis de esporopolenina en dos casos.

Durante la dehiscencia de las anteras, el estomio de las anteras es longitudinal y la dehiscencia es introrsa. Tanto septo interlocular como zona periestomial no poseen engrosamientos en sus células. La epidermis es persistente. El tejido conectivo de la antera posee engrosamientos, en anillos, en bandas longitudinales o puede carecer completamente de ellos. Se encuentra una capa de hipodermis conectiva de 1 célula de espesor que puede ser continua o estar interrumpida en la zona del haz vascular. Se encontraron tres tipos de engrosamientos en el endotecio, siempre sobre las paredes anticlinales: (1) transversales rectos, (2) transversales inclinados y (3) longitudinales. Las especies pueden poseer uno o los tres tipos de engrosamientos al momento de la antesis.

Desarrollo de ovarios, óvulos y semillas

El ovario fue ínfero, bicarpelar, gamocarpelar y unilocular conteniendo un único óvulo anátropo y unitegumentado de placentación basal. El único tegumento es masivo de 12 a 25 células de espesor y asimétrico desde su origen con un único lóbulo convexo. Los óvulos fueron tenuinucelados incompletos con una única capa de epidermis nucelar, endotelio uniseriado de células uninucleadas, hipóstasis y obturador de origen funicular. El endotelio tiene doble origen, tegumentario-funicular y durante la megagametogénesis se polariza con sus células alargándose en sentido radial y sus paredes primarias desarrollando engrosamientos de transferencia engrosándose sobre todo hacia el extremo micropilar.

Los embriones fueron cotiledonares, axiales continuos de tipo espatulado, con un eje hipocótilo-radícula y dos cotiledones plano convexos y yuxtapuestos ocupando entre tres cuartos y un tercio de la longitud total del embrión. El meristema subapical del eje (SAM) presenta forma de domo o no y el meristema subapical de la raíz (RAM) tiene tres zonas principales: caliptra, centro quiescente y estela con procámbium y periciclo. El mesofilo cotiledonar es dorsiventral con células en empalizada e isodiamétricas separadas por procámbium.

Respecto a la pared del fruto se encuentra un pericarpo (exocarpo) con tricomas barnadesioides, reducido o tendiendo a la reducción del meso y endocarpo. Por debajo se encuentran hasta 8 capas de remanentes del tegumento del óvulo, que está más engrosado hacia la base de la cipsela. En esta capa se pueden encontrar canales lisígenos, cristales o granos de almidón. Se encuentran entre 7 y 10 haces vasculares y una capa o película de material denso de naturaleza péctica en la base.

De acuerdo a las reservas los embriones son exendospermados. con endosperma unicapa. Los cotiledones almacenan proteínas como sustancia de reserva principal en cuerpos proteicos con 1 a 3 inclusiones globoides y cristales proteicos pequeños. Los lípidos como reserva secundaria están ubicados en cuerpos lipídicos de menor tamaño rodeando los cuerpos proteicos principales. En algunos casos se observaron escasos cristales de almidón con cruz de malta diferenciada en el parénquima cotiledonar.

5. DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo de inflorescencias y flores

El desarrollo del capítulo y de las flores son dos procesos relacionados ya que de la diferenciación y fraccionamiento del meristema de la inflorescencia dependerá la diferenciación de las flores. A su vez el surgimiento de los meristemas florales (primordios) y su posterior organogénesis determinarán las partes del capítulo y su estructura final.

Los resultados del estudio del desarrollo del capítulo y del desarrollo floral sobre una muestra representativa de los tipos de capítulo presentes en Barnadesioideae, es decir, discoideos, disciformes y radiados, muestran que esta subfamilia es diversa en los procesos de desarrollo.

5.1.1 Desarrollo de inflorescencias

El Meristema de la inflorescencia

Las Barnadesioideae pueden tener meristemas de la inflorescencia planos o convexos. No se observó una correlación de la forma del meristema con el tipo de capítulo (discoideo, disciforme, radiado) pero sí con la forma de los receptáculos: los meristemas florales y el subsiguiente receptáculo poseen la misma forma en los taxones aquí estudiados.

Los meristemas de los capítulos discoideos homógamos de *Chuquiraga erinacea* y *Schlechtendalia luzulifolia* y del capítulo disciforme heterógamo de *Dusenilla patagonica* son convexos, en forma de domo bajo (misma etapa del desarrollo) mientras que los meristemas de los capítulos discoideos y homógamos de *Arnaldoa weberbaueri*, *Chuquiraga jussieui*, *C. ulicina* y el capítulo radiado de *Barnadesia odorata* son planos, al igual que para *A. macbrideana*, también con capítulo discoideo y homógamo ilustrado por Erbar & Leins (2000).

En la familia Asteraceae el meristema de la inflorescencia puede ser plano, convexo, turbinado o cónico. La forma del meristema de la inflorescencia no muestra un patrón o consistencia sistemática aunque hay una tendencia de los capítulos homógamos a poseer meristemas más planos y de los heterógamos a ser turbinados como en *Gamochoaeta purpurea* y *Pluchea foetida* (Harris, 1995). Las observaciones de esta tesis a nivel de la subfamilia tratada lo re-confirman.

Zonación Meristemática en *Barnadesia odorata*

Durante el establecimiento del meristema de la inflorescencia en *Barnadesia odorata* se observa, previamente a la aparición de primordios, un surco que delimita dos áreas: un anillo periférico donde se desarrollarán las flores de radio, y una zona central donde se desarrollarán las flores del disco. Este fenómeno que puede denominarse “Zonación Meristemática” no ha sido registrado hasta el momento para estructuras de inflorescencias en Angiospermas. Ejemplos de fenómenos de zonación en Angiospermas son la zonación de meristemas vegetativos, tallo y raíz, de naturaleza cito-histológica como en túnica-carpus o los histógenos (Kwiatkowska, 2004).

La zona anular periférica que se delimita en *Barnadesia odorata* podría asociarse a la existencia de dos controles genéticos: uno para la zona del disco y otro para la del radio. Existen en la bibliografía antecedentes de controles genéticos diferenciales en el desarrollo del capítulo, específicamente en la formación de flores del radio en *Gerbera* (Zhao *et al.*, 2016). En ese trabajo se ha comprobado que las flores del radio muestran un patrón ontogenético distinto controlado por genes de la identidad del meristema floral de la función *LEAFY* (*LFY*) en mutantes que han sufrido la supresión de estos genes. Se observa que las flores del radio no se inician como primordios individuales sino como grupos de dos o tres primordios juntos y para los autores este patrón ontogenético comparte similitudes con las unidades de grupos cimosos marginales presentes en las Calyceraceae (Pozner *et al.*, 2012). Para los autores esto es suficiente para hipotetizar que el capítulo no podría derivar de un único meristema ya que la pérdida de la expresión de genes de la identidad del meristema floral como es en efecto el gen *LFY*, debería mostrar los mismos cambios fenotípicos en ambos tipos de flores.

De esta manera, la zonación meristemática observada en *Barnadesia odorata* podría estar respondiendo a controles genéticos subyacentes que aún no han sido elucidados y podría ser una evidencia de que el capítulo no deriva de un racimo, sino de una inflorescencia más compleja (cfr. Pozner *et al.*, 2012).

Dirección del fraccionamiento del meristema y de la organogénesis para el capítulo: el atraso de las flores del radio.

En Barnadesioideae se encontró que la progresión del fraccionamiento del meristema de la inflorescencia en los capítulos fué simultánea y centrípeta mientras que la progresión de la organogénesis en el capítulo fue simultánea, centrípeta, centrípeta con atraso en las flores del radio y centrífuga (Fig. 67). No se observó en ningún caso progresión bidireccional.

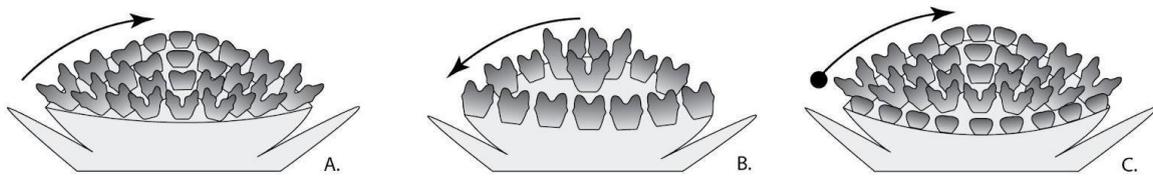


Figura 67. Esquema simplificado de la progresión de la organogénesis en el capítulo. A. Progresión centrípeta. **B.** Progresión centrífuga. **C.** Progresión centrípeta con atraso de las flores del radio.

En las especies con capítulo discoideos homógamos la progresión, tanto del fraccionamiento del meristema como de la organogénesis para el capítulo, fué en general centrípeta, excepto en *Chuquiraga avellanadae* que fué simultánea.

En las especies con capítulos disciformes y heterógamos estudiadas, como *Dusenilla patagonica*, la progresión del fraccionamiento del meristema fue centrípeta y de la organogénesis centrípeta con atraso en las flores del radio. En *Doniophyton weddellii* las flores del radio de tamaño más pequeño al final de la organogénesis indicarían un retraso en el desarrollo por lo que el proceso ontogenético sería similar al observado en *D. patagonica*.

Barnadesia odorata, de capítulo radiado y homógamo, muestra una progresión simultánea durante el fraccionamiento del meristema y una progresión centrífuga en la organogénesis para el capítulo. En esta especie, mientras que primordios del disco tienen los verticilos C-K desarrollados, los del radio permanecen en estado de embudo, es decir están atrasados. Debido a que existe una sola serie de flores radiales podría decirse que en este caso la progresión de la organogénesis para el capítulo es centrífuga o centrípeta con atraso de las flores del radio.

Tanto en *B. aculeata* como en *B. odorata* las flores del radio están atrasadas respecto a las del disco, evidenciado por el menor desarrollo del verticilo K para el mismo momento.

La progresión centrípeta del desarrollo de la inflorescencia generalmente sucede en capítulos isomorfos y homógamos (Harris, 1995). Esta autora describe para las especies heterógamas una tendencia a la supresión momentánea en el desarrollo de las flores del radio, que es más acentuada cuanto mayor es la diferencia morfológica entre ambos tipos de flores. Este fenómeno denominado “ray lag” o atraso del desarrollo de las flores del radio puede ir desde un grado leve hasta su más pronunciada expresión: la progresión bidireccional, un patrón simultáneo originado desde el ecuador del meristema que produce primordios de flores del disco en dirección centrípeta y primordios de flores del radio (con más de una serie) en dirección centrífuga (Harris, 1994, 1995).

En asteráceas con capítulos dimorfos y heterógamos y varias series de flores, el atraso de las flores del radio se produce desde el comienzo del desarrollo (Harris, 1995). Cuanto mayor es la diferencia morfológica y funcional (de la función sexual) y mayor el número de series de flores, más tiempo se sostiene este atraso. En *Barnadesia odorata* el atraso de las flores del radio podría atribuirse a la diferente morfología de corola y papus entre flores del radio y disco, (4+1 y cerdas plumosas vs 5+0 liguladas y cerdas setáceas), y no a la sexualidad de las flores ya que ambos tipos son hermafroditas.

En la otra especie que presenta flores del radio más pequeñas y femeninas, *Duseniella patagonica*, también se comprueba el atraso a partir en la organogénesis y la ausencia completa del verticilo A.

Patrón filotáctico y disposición “caótica” de primordios

En todas las especies estudiadas en que pudo observarse el fraccionamiento del meristema, *Chuquiraga avellanadae*, *C. erinacea*, *C. jussieui*, *Schlechtendalia luzulifolia*, *Duseniella patagonica* y *Barnadesia odorata*, existe hacia el final de este estadio abundante receptáculo libre entre los primordios florales, sobre todo hacia el centro de la inflorescencia- (que será cubierto por un indumento abundante ya que las Barnadesioideae poseen receptáculo piloso (Stuessy *et al.*, 2009) y los primordios en *S. schlechtendalia* y *D. patagonica* se encuentran desordenados. Esta característica la mencionan Erbar & Leins (2000) para *Arnaldoa macbrideana* denominándola “arreglo suelto de primordios” y lo establecen como un estado “primitivo” o “basal” para la familia, en contraposición a “un espaciamiento óptimo de los primordios florales” como la característica “derivada” estereotípica esperable para Asteraceae. Aunque Harris (1995) no observa ni menciona esta característica para Asteraceae, en su trabajo se observa en el caso de *Calendula officinalis*.

Estudios más recientes (Zhang *et al.*, 2021) también mencionan esta característica para *Gerbera hybrida* y la denominan “disposición caótica de primordios” observando que hacia el centro de la inflorescencia hay un desorden de los primordios, es decir, el ordenamiento en parásticas se pierde. En el mismo trabajo los autores intentan explicar este fenómeno y el patrón filotáctico en el capítulo de Asteraceae mas allá de la regla de Hofmeister y la hipótesis del campo inhibitorio.

El patrón filotáctico, donde el número de parásticas sigue la secuencia de Fibonacci, ha sido explicado por el surgimiento de los primordios siguiendo la espiral áurea y por el concepto de campo inhibitorio (Hofmeister, 1868; Kirchhoff, 2003) que propone que los nuevos primordios aparecen periódicamente en la posición donde hay más espacio disponible porque cada primordio genera un campo inhibitorio que previene la iniciación de nuevos

primordios en sus alrededores (Shi & Vernoux, 2018). Por lo tanto, los primordios incipientes son iniciados donde la inhibición es mínima.

Zhang y coautores (2021) proponen la influencia de otro factor que llaman “desplazamiento lateral de primordios” y consiste en la idea de que los primordios pueden ser desplazados luego de su iniciación debido a que (1) el nuevo primordio no se ubica en una posición simétrica en el nuevo intervalo y (2) el meristema/ receptáculo al mismo tiempo se está expandiendo, lo que modifica la posición de los primordios.

Mediante una simulación por modelo integrativo, comprueban que la disposición caótica de primordios tiene dos causas: (1) la escasez de espacio disponible y (2) la progresión de un anillo activo, el llamado “frente de iniciación de primordios” o “zona morfogenéticamente activa” cuya actividad comienza en el margen del meristema y va progresando centripetamente dando origen a brácteas y primordios (Fig. 68). Este frente constituye el límite entre meristema (zona indiferenciada central) y receptáculo (zona de brácteas y primordios florales diferenciados). Cuando toda la superficie está consumida/ocupada por primordios, el frente de iniciación desaparece.

En resumen, el anillo controla el surgimiento sincrónico de primordios o *burst*, y carece de simetría circular sufriendo cambios en su circunferencia durante el desarrollo ejerciendo un control global débil en la inflorescencia y no pudiendo dirigir por sí solo el surgimiento de los primordios en forma global.

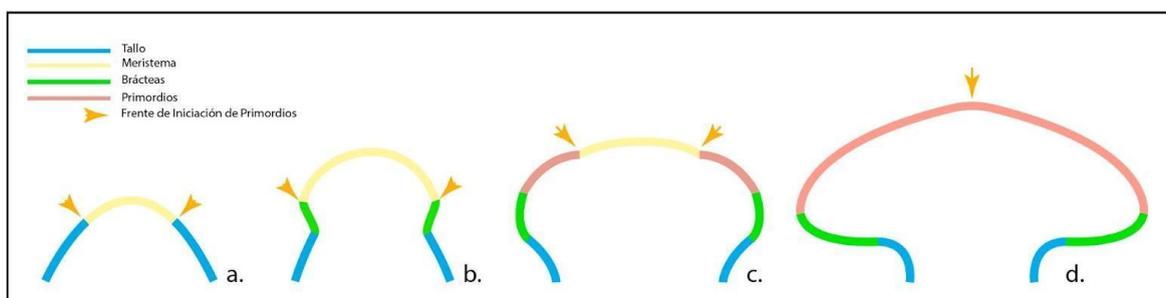


Figura 68. Esquema simplificado del avance del frente de iniciación de primordios. Desarrollo de capítulos de *Gerbera hybrida* (Zhang *et al.*, 2021).

Las observaciones hechas en este trabajo de tesis respecto a este tema son por lo tanto consistentes con los trabajos publicados hasta el momento.

Se corrobora que el “arreglo suelto” o “disposición caótica de primordios” es un fenómeno que puede ser trazado hasta la subfamilia más basal de Asteraceae ya que es extendido en las Barnadesioideae y ha sido registrado en otras Asteraceae, incluida *Arnaldoa macbrideana* y que según las hipótesis imperantes puede ser explicado por una falta de espacio en el receptáculo y el avance del anillo activo.

Orientación variable de las flores respecto al eje del capítulo

La orientación de las flores respecto del eje del capítulo es un aspecto poco estudiado en Asteraceae. En el presente estudio se observó que en *Barnadesia aculeata* y *B. odorata* la orientación de las flores del radio es con un lóbulo adaxial hacia el centro del capítulo y dos lóbulos abaxiales hacia la periferia (Fig. 69).

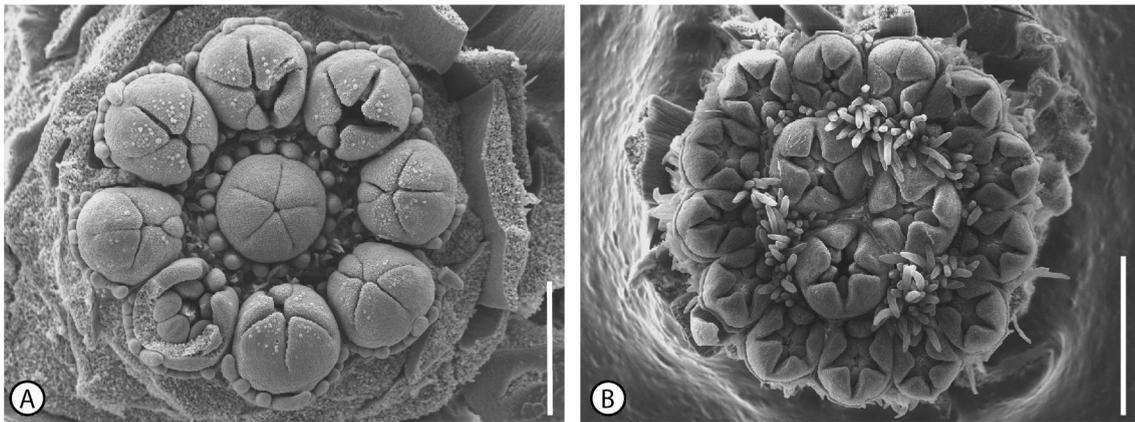


Figura 69. Orientación variable de las flores respecto al eje del capítulo. A. *Barnadesia aculeata*. B. *Barnadesia odorata*. Escala 500 micrones.

La orientación más frecuente en las flores de las Eudicotiledóneas es con dos lóbulos adaxiales orientados hacia el eje portador de la flor y un lóbulo abaxial (Ronse de Craene, 2010 Fig. 70) y está determinada por la posición de los sépalos y, cuando presentes, de las bractéolas (Erbar & Leins, 2010; Ronse de Craene, 2010). En Asteraceae, a pesar de la reducción e iniciación tardía del cáliz, tanto las flores del disco como las del radio poseen la misma orientación, con dos lóbulos adaxiales hacia el centro del capítulo y uno abaxial hacia la periferia del capítulo.

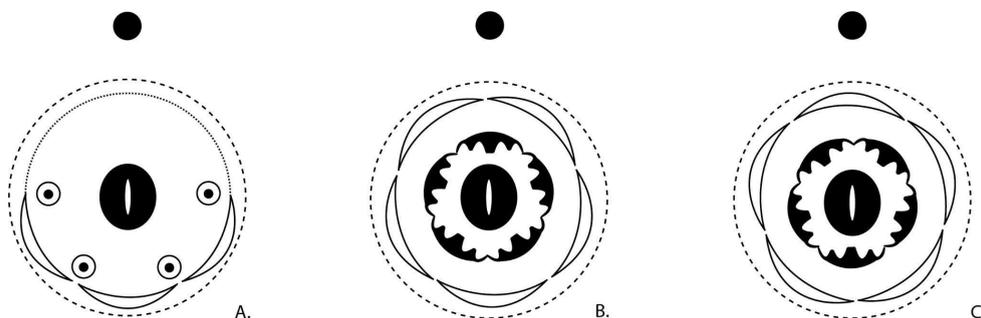


Figura 70. Diagramas Florales de Asteraceae y *Barnadesia odorata*. A-B. Orientación de las corolas en Asteraceae. A. Flor del radio con corola reducida, con un lóbulo en posición abaxial. B. Flor del disco con un lóbulo abaxial y dos lóbulos adaxiales. C. Flor del radio con dos lóbulos abaxiales y un lóbulo adaxial (*Barnadesia odorata*).

Una orientación variable de las flores en el capítulo ha sido observada en *Arnaldoa macbrideana* (Erbar & Leins, 2000). Estos autores remarcan que la orientación de las flores hacia el centro del capítulo no es fija y que pueden observarse todas las transiciones entre una posición adaxial y abaxial de uno de los pétalos (Erbar & Leins, 2000). Esta variación en la orientación de las flores también se ha observado en otras Asteraceae, específicamente en las flores más próximas al centro del capítulo (Uimari *et al.*, 2004, Fig. 6A; Harris, 1995, Fig. 66:8 flor a la izquierda).

Este tema no se ha estudiado en Calyceraceae, familia hermana, donde se podrían encontrar diferentes orientaciones de las flores en los grupos cimosos periféricos como consecuencia de agrupar flores de diferentes órdenes de ramificación (cfr. Pozner *et al.*, 2012).

De esta manera, se plantea entonces el interrogante sobre si el cambio de orientación de las flores en Asteraceae podría estar relacionado con diferentes eventos como: (1) la pérdida de la filotaxis hacia el centro del capítulo, (2) la existencia de áreas del receptáculo libres, (3) los cambios en la simetría de las flores del radio (en el caso de algunas Barnadesioideae), (4) con el desarrollo tardío del papus y sus modificaciones o (5) el capítulo como resultado de la condensación de flores en varios órdenes de ramificación.

Al menos en *Barnadesia odorata* se observó una relación entre la orientación de las flores del radio, la morfología de sus corolas subbilabiadas 4+1 (exclusivas de las barnadesioideas), y la zonación del meristema del capítulo.

La flor terminal y otras consideraciones del capítulo de Barnadesioideae

En este trabajo de tesis se estudió la ontogenia de dos especies con capítulos radiados dimorfos con una flor del disco terminal, *Huarpea andina* y *Barnadesia aculeata*, y se observó la presencia de flor terminal en dos especies de capítulos isomorfos discoideos con bajo número de flores del género *Chuquiraga*, *C. avellanadae* y *C. erinaceae*, lo que constituye una novedad.

Varias especies de la subfamilia Barnadesioideae presentan capítulos radiados con una única flor del disco terminal. En el género *Huarpea*, la única especie *Huarpea andina* (número y disposición de flores 5+1, cinco radiales y una del disco) y el género *Barnadesia* con varias especies con capítulos 8+1 (8 flores del radio y 1 flor del disco) como *Barnadesia aculeata*, *B. jelskii*, *B. glomerata*, *B. macbrideai*, *B. pycnophylla*, *B. horrida* y *B. macrocephala*.

Hay registros en la bibliografía de presencia de flor terminal en otras asteráceas basales como *Gamochaeta purpurea* (Harris, 1995) y *Gerbera hybrida* (Teeri *et al.*, 2006). Es muy probable que la flor central de las especies de *Tessaria*, sea también una flor terminal.

La presencia de flor terminal contrasta con la definición tradicional de inflorescencia de Asteraceae, que se ha caracterizado históricamente como indeterminada basada en la ausencia de flor terminal (Weberling, 1989). El capítulo de Asteraceae tradicionalmente ha sido considerado como una inflorescencia indeterminada racemosa (Cronquist 1955, 1977; Weberling, 1989) surgida de un meristema que produce flores laterales en dirección centripeta de manera indefinida, porque siempre regenera y mantiene una zona de células iniciales, y en consecuencia carece de una flor terminal.

Varias características morfológicas y espaciales del desarrollo ontogenético que se desprenden de los resultados de esta tesis, demuestran que el capítulo de Barnadesioideae no posee la estructura típica del capítulo de Asteraceae (Fig. 71). La presencia de flor terminal, la zonación meristemática, el patrón filotáctico alterado -que resulta en una disposición caótica de primordios y la presencia de zonas de receptáculo libre- y la orientación variable de las flores en el capítulo contribuyen a la idea original de Erbar & Leins (2000) que, basados en los estudios ontogenéticos de *Arnaldoa macbrideana*, sugieren que el ancestro de las asteráceas podría haber tenido una inflorescencia compleja. Una nueva clasificación basada en los meristemas de las inflorescencias y los sistemas de ejes florales (*flowering shoot systems*) (Claßen-Bockhoff & Bull Hereñu, 2013), estudios en Calyceraceae (Pozner *et al.*, 2012), familia hermana de las Asteraceae, y nuevas evidencias en el campo de la genética (Teeri *et al.*, 2006; Broholm *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2016; Elomaa *et al.*, 2018.; Zhang *et al.*, 2021) revelan nueva información respecto a la arquitectura de la inflorescencia. Claßen-Bockhoff & Bull-Hereñu (2013) formulan una clasificación de las inflorescencias basada en el tipo de meristema. Para los autores la ausencia de flor terminal es característica de una “inflorescencia abierta” y ésta puede originarse a partir de dos tipos de meristema: **Meristemas Open I** que mantienen una zona central de células iniciales y continúan elongándose mientras producen meristemas laterales en secuencia acrópeta y los **Meristemas Open II**, que carecen de una zona central de células iniciales y muestran una histología homogénea manto-núcleo, y se consumen completamente en la producción de primordios. De acuerdo a estos autores una inflorescencia indeterminada sería sólo aquella derivada de Meristemas tipo Open I, que mantienen una zona central de células iniciales, mientras que las derivadas de Meristemas tipo Open II serían determinadas aún careciendo de flor terminal.

Para las inflorescencias de Asteraceae y Apiaceae establecen que derivan de meristemas que, si bien comparten características con los meristemas Open II como la histología manto-núcleo y un estadio inicial desnudo, se parecen más a los meristemas florales por pasar por una etapa extra de fraccionamiento antes de la producción de órganos florales (organogénesis). Tanto Asteraceae como Apiaceae poseen pseudanto y podrían ilustrar que sus meristemas parecen flores al nivel meristemático pero también en apariencia. Para los

autores la adquisición de capítulos en Asteraceae podría haber evolucionado por expansión de un meristema floral y su posterior fraccionamiento.

Estudios de desarrollo de las inflorescencias de las Calyceraceae (Pozner *et al.*, 2012) permitieron interpretar las inflorescencias de esta familia como cefalodios (tirsoides muy condensados con forma de cabezuela) hecho que se relaciona con la presencia de una flor terminal en las inflorescencias del grupo hermano de las Asteraceae. La reconstrucción preliminar de estados ancestrales en el clado Asteraceae+Calyceraceae (Pozner *et al.*, 2012) sugiere que el ancestro compartido por estas familias también poseía cefalodios y que el capítulo de Asteraceae podría haber evolucionado desde un simple cefaloide (un botrioide-tirsoide muy condensado) mediante la pérdida de flor terminal y la supresión de los grupos cimosos. Los espacios libres del receptáculo pueden estar asociados a la pérdida de esta flor terminal. Por estas razones, la presencia de una flor central terminal en algunas especies de Barnadesioideae no sería más que la expresión de un carácter ancestral que confirma la relación morfológica con las inflorescencias de las Calyceraceae.

El concepto de las áreas del radio y del disco como dominios independientes desde antes de la iniciación derivado de las observaciones en *Barnadesia odorata* y la hipótesis de Pozner *et al.* (2012) de que las flores del radio pueden haber surgido como la consecuencia de la transformación de los meristemas de los grupos cimosos marginales observados en las Calyceraceae es apoyado por nuevas evidencias en el campo de la genética.

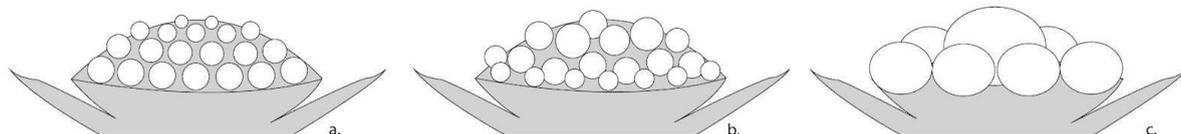


Figura 71. Esquema simplificado de tipos de capítulos en Barnadesioideae. Dirección del fraccionamiento, espaciado y tamaño de primordios y presencia/ausencia de flor terminal. **A.** Capítulo discoideo típico de asteráceas con progresión del fraccionamiento del meristema acrópeto, espaciado óptimo de primordios, tamaño decreciente de los mismos y ausencia de flor terminal. **B.** Capítulo discoideo de tipo *Arnaldoa macbrideana* y *Schlechtendalia luzulifolia* con progresión del fraccionamiento del meristema acrópeto, espaciado no óptimo de primordios, tamaño variable de los mismos y ausencia de flor terminal. **C.** Capítulo radiado de tipo *Barnadesia aculeata* y *Huarpea andina* con espaciado no óptimo de primordios, tamaño variable de los mismos y flor terminal.

Estudios recientes en *Gerbera* y mutantes sugieren que las zonas radial y disco de la inflorescencia responden a programas genéticos diferentes y que los primordios del radio en Asteraceae podrían haber evolucionado mediante la supresión de las unidades cimosas de la inflorescencia de Calyceraceae por silenciamiento de genes de la identidad del meristema floral. En su trabajo demostraron que los genes homólogos del clado *CYCLOIDEA2* se expresaban en forma predominante en los primordios emergentes de las flores del radio,

mientras que escasa o ninguna expresión se detectó en los primordios del disco (Teeri *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2016; Elomaa *et al.*, 2018).

Otros estudios en dominios proteicos tipo CYCLOIDEA-TCP, homólogos del CYC de *Gerbera* GhCYC2, han concluido que este factor se expresa únicamente en las flores del radio y que su sobreexpresión en la región del disco ocasiona que estas flores adquieran morfologías similares a las del radio (Broholm *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018). También se ha demostrado que la supresión de la expresión de genes *GhLFY* convertía los primordios del radio en grandes meristemas que luego se subdividían formando estructuras ramificadas (Zhao *et al.*, 2016). El desarrollo tardío de las flores del radio y el hecho de que surgen exclusivamente en las axilas de la última serie de brácteas involucrales sumado a éstas evidencias genéticas en mutantes podría ser una evidencia de que las flores del radio son unidades cimosas periféricas muy reducidas (Pozner *et al.*, 2012).

La zonificación del meristema, dada por el anillo, observada en *Barnadesia odorata* contribuye a la idea de la pre-división de un campo radial y uno del disco en el meristema. Esta novedad evolutiva requiere más estudios tanto morfológicos ontogenéticos como genéticos en las especies estudiadas, otras barnadesioideas así como en las subfamilias cercanas para contribuir a la comprensión del origen evolutivo del capítulo.

5.1.2 Desarrollo de flores

Diferenciación de los verticilos florales

Especies con distinto tipo de capítulo compartieron el mismo orden de diferenciación de los órganos florales por lo que podemos decir que la secuencia de aparición de los verticilos florales en el primordio no guarda relación con el tipo de capítulo

En todos los casos analizados se encontró que la diferenciación progresa en dirección centripeta para los verticilos corola, androceo y gineceo (CAG) y que la corola es el primer verticilo siempre (Fig. 72).

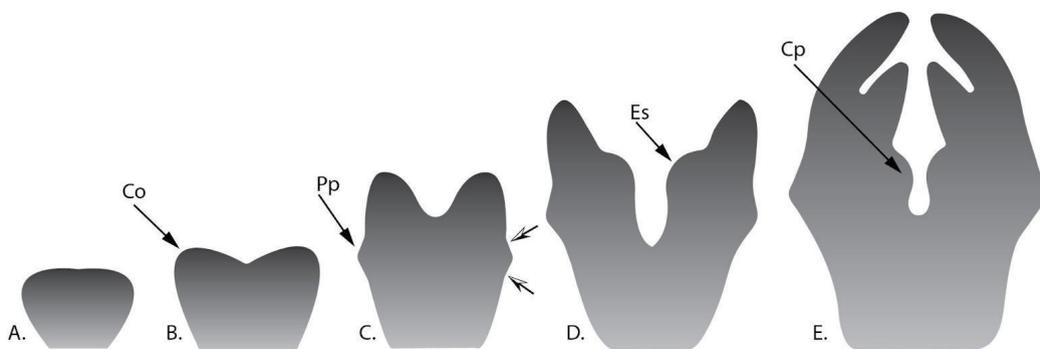


Figura 72. Esquema simplificado de la organogénesis en el primordio floral. A. Tapón. **B.** Embudo, diferenciación simultánea de los lóbulos de la corola a partir del anillo meristemático de la corola. **C.** Profundización del embudo y diferenciación del papus. Primera y segunda constricciones

(flechas). **D.** Formación de androceo (estambres). **E.** Formación del gineceo (carpelos). **Co:** corola. **Pp:** papus. **Es:** estambres. **Cp:** carpelos.

Por su parte el verticilo más externo, cáliz (K), aparece en distintos momentos de la ontogenia, según la especie, pero nunca primero. Esto concuerda con lo establecido para el orden de iniciación de los verticilos en las flores de Asteraceae (Small, 1919; Sattler, 1973; Harris, 1995). Por lo tanto, en Barnadesioideae, al igual que en el resto de Asteraceae, la iniciación del primer verticilo es heterocrónica con respecto al resto de Angiospermas -donde el verticilo cáliz se desarrolla primero-. La aparición tardía del cáliz (K) también se encuentra en la familia hermana de Asteraceae, Calyceraceae. Mientras que en el género *Acicarpha* la secuencia es KCAG, en el resto de los géneros estudiados (*Calycera*, *Gamocarpha*, *Boopis*) la secuencia es CKAG (Pozner, 2012).

Respecto a la corola se observó que los lóbulos corolinos siempre se originaron simultáneamente a partir de un anillo meristemático de la corola, igual que lo mencionan Erbar y Leins (2000) para *Arnaldoa macbrideana* donde los lóbulos surgen del borde del primordio en el estado de embudo.

Estudios ontogénicos en la subclase Asteridae revelaron que la condición simpétala del tubo corolino es adquirida en Asteraceae muy tempranamente, en comparación a otras familias de simpétalas como Boraginaceae o Apocynaceae (Erbar, 1991), siendo el estado de embudo (*funnel*) la expresión de esta condición. Sin embargo, Harris (1995) establece que el anillo meristemático de la corola es solo observado en Asteroideae por lo que lo considera un carácter avanzado para la familia y que los lóbulos corolinos pueden surgir en forma simultánea o unidireccional (*Erigeron philadelphicus*, Harris, 1991).

Respecto a la iniciación de los estambres (androceo), en todas las especies estudiadas éstos surgieron simultáneamente en posición alternipétala. Aunque la aparición simultánea de estambres es frecuente, en Asteraceae éstos pueden surgir también en forma espiral o unidireccional como fue reportado para *Senecio vernalis* (Oraei *et al.*, 2013) y *Xeranthemum squarrosum* (Dadpour *et al.*, 2012), respectivamente.

La iniciación del papus y su homología.

En todos los taxones de Barnadesioideae analizados en este trabajo de tesis la iniciación del papus resultó ser integral con la organogénesis y secuencial, surgiendo tres o cinco cerdas en forma simultánea (Fig. 73), no observándose en ningún caso el surgimiento tardío (pasada la organogénesis) del mismo como enaciones o sobrecrecimientos del aquenio (Harris, 1995). La aparición de todas las cerdas finalizó durante el crecimiento zonal, al mismo tiempo que los lóbulos de la corola se cerraron apicalmente.

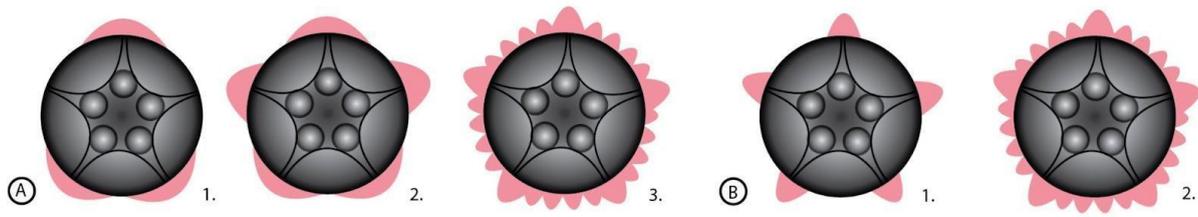
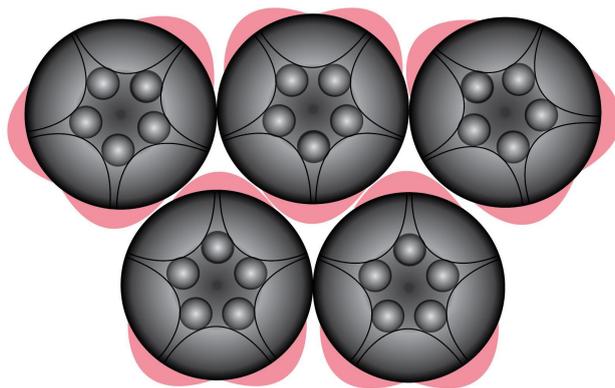


Figura 73. Esquema simplificado de la iniciación secuencial del papus. A. A partir de tres cerdas alternipétalas, en un primer estadio (1), luego cinco cerdas (2) y finalmente el resto. **B.** A partir de cinco cerdas alternipétalas (1) y luego surgen las restantes (2). (Harris, 1995).

Aunque el área del futuro papus se delimita tempranamente (y se diferencia del ovario por carecer de indumento), no se observó un anillo meristemático del papus (meristema circular prominente o torus *sensu* Harris, 1995) del cual surgen las cerdas, y que sí se presenta en las tribus Astereae e Inuleae (Harris *et al.*, 1991). Erbar y Leins (2000) establecen para *Arnaldoa macbrideana* que el papus tiene una iniciación temprana y que protruye como un anillo meristemático irregular al compararlo con la misma estructura en especies de Astereae e Inuleae pero en el caso de *A. macbrideana* el anillo no está bien definido.



Las observaciones realizadas en esta tesis sitúan el origen del papus como de iniciación secuencial, no obstante también se concluye que durante los estadios tempranos la iniciación secuencial es indistinguible de la iniciación al azar.

En el tipo de desarrollo del papus “al azar” las cerdas del papus surgirán donde haya espacio disponible, lo que

Figura 74. Esquema simplificado de la iniciación al azar del papus

se convierte en el factor determinante., esto lo hace impredecible ya que estará sujeto a efectos de aglomeración de primordios. Pero el espacio disponible suele coincidir con una posición alternipétala (Fig. 74).

Aunque el origen del papus ha sido objeto de controversia, en Barnadesioideae se ha sugerido que éste es derivado de un cáliz sinsépalo (teoría del filoma) debido a que sus cerdas presentan los mismos tipos de tricomas que los que se encuentran en todas las demás partes florales. El papus de Barnadesioideae no sería homólogo al de otras Asteraceae que representan desarrollos *de novo* de esa estructura (teoría del tricoma) (Jeffrey, 2009).

Trabajos recientes con evidencias micro-morfológicas y de expresión de genes florales apoyan la homología de ambas estructuras en Asteraceae: la iniciación secuencial del

papus en cinco puntos alternipétalos sería una indicación del origen sepaloide del papus y del *bauplan* pentámero de las flores mientras que el anillo meristemático del papus sería la fusión congénita de los sépalos y se formaría en todas las Asteraceae (Vijverberg *et al.*, 2021). Estudios de genes MADS box en plantas transgénicas de *Gerbera* comprobaron que la desregulación de genes *gerbera agamous*-like (*gaga2*, ortólogos de genes homeóticos de la función C) y *gerbera globosa*-like (*gglo1*, ortólogos de genes homeóticos de la función B) resulta en cambios en la identidad de los verticilos gineceo y corola (G-C) para parecerse al verticilo cáliz y los órganos quiméricos desarrollaban cerdas incipientes (Yu *et al.*, 1999).

De acuerdo con Vijverberg *et al.* (2021), la susceptibilidad a cambios evolutivos del papus en Asteraceae y su adaptación a una nueva estructura de función dispersiva podría explicarse como resultado de la independencia de este verticilo en la reproducción y una redundancia de su función protectora en la flor que es ejercida por las brácteas involucrales en todo el capítulo

Diferenciación de las flores del radio

Las flores en Asteraceae se clasifican por la morfología de la corola, simetría y sexualidad (Bremer, 1994), pero durante el desarrollo temprano los primordios de flores del radio pueden diferenciarse de los del disco por: (1) tamaño y/o (2) forma. La diferencia de tamaño es producto del fraccionamiento diferencial del meristema de la inflorescencia que establece una asimetría inicial entre ambos tipos. Harris (1995) por su parte estableció una diferencia entre las flores radiales y las del disco de acuerdo a la forma del primordio durante la iniciación temprana: forma triangular o bilateral para primordios del radio y forma redondeada para los del disco.

Se estudiaron 4 especies con flores del radio: *Dusenilla patagonica* y *Doniophyton weddelli* de capítulos disciformes, con pocas flores del radio con corola filiforme y femeninas, y *Barnadesia aculeata* y *B. odorata* de capítulos radiados, con flores del radio con corolas subbilabiadas (4+1) y hermafroditas.

En *Dusenilla patagonica*, durante la iniciación, los primordios de las flores filiformes del radio son más pequeños que los del disco y de forma triangular/poligonal, es decir se diferencian tanto por tamaño como por forma. Durante la organogénesis su desarrollo se atrasa y se diferencian las corolas actinomorfas (tubulosas filiformes) y no se inician los estambres.

Los primordios del radio de *Barnadesia odorata* son de tamaño más pequeño que los del disco pero ambos tipos son redondeados, por lo que se diferencian sólo por tamaño. Es importante mencionar que en *B. odorata* las flores del radio poseen corola cigomorfa subbilabiada (4+1) que es exclusiva de Barnadesioideae, y además son hermafroditas, por lo que aunque hay una diferenciación de morfología de las corolas entre las flores, ya que

las flores del disco poseen corolas liguladas (5+0) pero no hay diferencia de sexo. La diferenciación de la corola de *B. odorata* y *B. aculeata*, sucede en la organogénesis tardía, cuando ésta se vuelve cigomorfa esbozando un labio interno linear.

En *Schlechtendalia luzulifolia*, aunque el capítulo es discoideo, es decir todas las flores con la misma corola y sexualidad, se encontraron primordios de distinta forma y tamaño: triangulares, pentagonales y redondeados. Durante la iniciación temprana los primordios marginales eran triangulares mientras que los centrales pentagonales y de mayor tamaño (Fig. 71 B).

En los casos descritos en esta tesis los primordios del radio se diferencian por su menor tamaño, y como producto de un fraccionamiento diferencial del meristema de la inflorescencia, en los capítulos radiados como *Barnadesia odorata*, en los disciformes como *Duseniella patagonica* y en los discoideos con gran número de flores como *Schlechtendalia luzulifolia*.

Respecto a la forma de los primordios, puede aplicarse la definición de flores del radio de Harris (1995) para identificarlas en *Duseniella patagonica*, pero no así para *Barnadesia odorata*, donde todos los primordios tienen misma forma, ni para *Schlechtendalia luzulifolia* donde se encuentra variedad de formas de primordios florales a pesar de que el capítulo tiene todas las flores iguales con corolas subbilabiada 4+1 y perfectas. En este caso de la forma de los primordios no dependería del tipo de flor resultante sino de la posición que éstos ocupan en el capítulo.

Unisexualidad de las flores del radio en *Duseniella* y *Doniophyton*

Con respecto al origen o desarrollo de la unisexualidad en los géneros de capítulos disciformes, en estados muy tempranos del desarrollo se pudo observar que las flores del radio de *Doniophyton weddellii* desarrollan estambres con anteras funcionales hasta bien avanzada la organogénesis mostrando desarrollo del tejido esporógeno normal. Sin embargo, en *Duseniella patagonica* para la misma etapa se observó que las flores del radio no poseen primordios de estambres o presentan primordios muy reducidos. Por lo tanto, *Duseniella patagonica* muestra un aborto más prematuro de las anteras o una ausencia completa del androceo respecto a *Doniophyton weddellii*.

Si en *Doniophyton weddellii* las flores del radio poseen tejido esporógeno puede afirmarse que los mecanismos de aborto actúan más tardíamente en el desarrollo, probablemente relacionado a la muerte celular programada (MCP) adelantada del tapete (Zhenzhen *et al.*, 2014) mientras que en *Duseniella patagonica* es posible que el carácter pistilado de sus flores del radio esté determinado por los genes controladores de la identidad de los verticilos florales que suprimen o silencian el desarrollo de este verticilo desde el comienzo o que los verticilos sí se inician pero se abortan muy prematuramente.

De acuerdo a una hipótesis propuesta por Tucker (1988) la pérdida de la iniciación de un órgano en un verticilo determinado altera el desarrollo del verticilo siguiente, pero esto se evita en caso de reducción de órganos -luego de sucedida la iniciación-. En concordancia con esto, se ha comprobado que en las flores pistiladas de *Helianthus annuus* (Cetinbas & Ünal, 2012) los estambres nunca son iniciados, y como consecuencia el desarrollo de los primordios de carpelos se detiene luego de cierto tiempo. Estudios de desarrollo en *Senecio vernalis* han comprobado que los carpelos se desarrollan normalmente cuando los primordios de estambres desaparecen o se reducen luego de iniciados (Oraei *et al.*, 2013). Desde el punto de vista del sistema reproductivo los géneros *Duseniella* y *Doniophyton* serían ginomonoicos, con capítulos de flores pistiladas y hermafroditas. En Asteraceae, y otras familias como Lamiaceae y Dipsacaceae, la ginomonoecia puede ser considerada como un sistema reproductivo bien establecido y no como un paso intermedio en la evolución hacia la dioecia.

La esterilidad de uno u otro de los ciclos sexuales en general y en este caso la esterilidad masculina genéticamente controlada, son fenómenos comunes y frecuentes entre las angiospermas, siendo una de las características de la división del trabajo que se observa en el capítulo. Las flores del radio, neutras o unisexuales, pueden funcionar sólo para atraer polinizadores o para proveer una plataforma de aterrizaje para los mismos. (Jeffrey, 2009).

En Asteraceae, desde el punto de vista de la maduración, las flores perfectas son dicógamas por protandria. El estilo con sus ramas estilares cerradas pasa a través del tubo estaminal arrastrando el polen y exhibiéndolo al exterior, conformando además el órgano presentador de polen. Más tarde los brazos estilares se abren y se curvan pudiendo dar lugar a la autofertilización. Pero cuando el capítulo tiene flores del margen pistiladas como en los géneros *Duseniella* y *Doniophyton*, entonces el pseudanto es protogino. El capítulo de Asteraceae por lo tanto, en comparación a flores solitarias, está de esta manera predispuesto a tener mayor plasticidad evolutiva con respecto a su sistema reproductivo (Jeffrey, 2009).

Aunque existe una variedad de sistemas reproductivos en la familia (homocalatíal monoclinos, ginomonoicos, monoicos o heterocalatíal dioicos, ginodioicos y monoicos) comparaciones con el grupo hermano (Calyceraceae) y otras Asteraceae no barnadesioides indicarían que la monoclinia homocalatíal sería la condición ancestral en Asteraceae (Stuessy & Urtubey, 2006; Torices *et al.*, 2006).

La especialización de la flor del disco de *Huarpea andina* y su tendencia a la esterilidad.

Las observaciones realizadas en esta tesis corroboran la descripción original de Cabrera (1951) para la flor del disco de *Huarpea andina* que tiende a la esterilidad ya que menciona

que esta flor posee sus verticilos fértiles atrofiados. El androceo y gineceo están presentes pero son de tamaño reducido, el ovario y aquenio son mucho más pequeños que el de las flores del radio y los cortes histológicos revelaron que no hay producción de tejido esporógeno en las anteras ni de óvulo, por lo que sería una flor estéril. Además el gineceo no posee un estilo tipo *Barnadesia*, caracterizado por ser cortamente bifido de ramas estilares redondeadas cada una con un borde transversal en su base y con una superficie estigmática cubriendo todo el interior (Erbar & Leins, 2015), como sí muestran las flores del radio. También se observó que la flor del disco en muchos casos carece de papus o tiende a una reducción de este (Cabrera menciona alguna cerda cortamente plumosa).

Existen otros registros en Barnadesioideae cuyas flores del disco tienden a la reducción de los verticilos fértiles. Las dos especies de *Barnadesia* subgénero *Bacasia* poseen capítulos con una única flor del disco con corola tubulosa al igual que *Huarpea* y tendiente a la unisexualidad. *B. parviflora* con una flor del disco estaminada con tres o cuatro estambres y *B. corymbosa* con una flor del disco pistilada o estaminada (Urtubey, 1999).

Aunque *Huarpea andina* posee su flor del disco sin función sexual, los verticilos persisten. Se han sugerido distintas razones para la retención de verticilos estériles en las flores en Asteraceae y otras familias de plantas siendo las principales su importancia para la atracción de polinizadores (Mayer & Charlesworth, 1991) y su rol en la optimización de la producción de semillas en tales inflorescencias (Sakai *et al.*, 2008) a cargo de las flores radiales. La retención de flores estériles puede también cumplir un rol en la división del trabajo del pseudanto y podría considerarse un tipo de flor especializada. Históricamente, la ocurrencia de flores especializadas del disco en las Barnadesioideae ha sido reconocida en el género *Barnadesia* por Delpino (1890) e independientemente por Goebel (1932) en *Barnadesia polyancantha*. Estudios más recientes mostraron que *Barnadesia spinosa* posee las tres flores del disco nectaríferas (con los nectarios ubicados en el ápice del ovario) con estilo reducido (superficie estigmática ausente) y no emergente y estambres rudimentarios (Vogel, 2015).

En conclusión, la adquisición de la esterilidad en la flor del disco de *Huarpea andina* podría representar un estadio necesario para la adquisición de la especialización de la misma en el pseudanto. Estudios futuros sobre la biología floral de la especie serían de suma importancia para elucidar las hipótesis al respecto.

Crecimiento Zonal: el desarrollo de los indumentos

El crecimiento zonal es la última etapa del desarrollo de los primordios florales y comienza al finalizar la organogénesis, cuando los cuatro verticilos están iniciados. El fin del crecimiento zonal no ha sido estudiado en esta tesis pero puede considerarse que finaliza en la antesis.

Los cambios principales del comienzo de este estadio son el alargamiento de los verticilos, y el desarrollo de arquésporas en los verticilos fértiles y la ramificación secundaria de las cerdas principales en el verticilo papus.

La diferenciación y/o alargamiento de los tricomas en los lóbulos de la corola y ovario también sucede durante el crecimiento zonal. Todas las Barnadesioideae poseen tricomas barnadesioideos como carácter diagnóstico, es decir la presencia de pelos uniseriados y bicelulares, con una célula basal cuadrangular de paredes gruesas y una célula terminal alargada y generalmente aguda en el ápice (o redondeada) y de paredes delgadas.

En *Chuiraga avellanadae* y *C. erinaceae*, los tricomas de la corola se diferencian muy incipientemente es decir al comienzo del crecimiento zonal, y posteriormente se alargan como así también las cerdas del papus. En *C. ruscifolia*, *C. ulicina*, *Dusenilla patagonica*, *Doniophyton weddellii*, *Barnadesia odorata* los tricomas de la pared del ovario se desarrollan antes que los de la corola al comienzo del crecimiento zonal mientras que la corola carece de tricomas en este momento.

En *Schlechtendalia luzulifolia* al comienzo del crecimiento zonal los primordios florales son glabros, el indumento se desarrollará en forma moderada durante el resto de esta etapa.

En *Barnadesia aculeata* las flores del radio están atrasadas, con un papus menos desarrollado pero los tricomas están más desarrollados en estas flores. Esto sugiere que el tiempo de desarrollo de los tricomas es independiente de los verticilos florales y varía entre las especies y los géneros.

También fue observado que la progresión del crecimiento de los tricomas es inversa para la pared del ovario y para los lóbulos de la corola. En la pared del ovario los tricomas crecen desde la base donde son más abundantes y se confunden con el indumento del mismo receptáculo, mientras que en la corola el crecimiento del indumento comienza distalmente, en los ápices de los lóbulos progresando hacia la base de la corola. En esta etapa el papus, que se circunscribe como un borde entre ambos verticilos, se distingue fácilmente porque es glabro.

5.2 Esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis

La esporangiogénesis temprana

Los resultados obtenidos muestran que en Barnadesioideae el proceso de formación de la antera comprende el establecimiento de una capa de células iniciales subepidérmicas de una célula de espesor y entre 6-8 células de ancho, en los cuatro ángulos del primordio tetralobulado de la antera (Fig. 18) lo que concuerda con las observaciones de Pullaiah (1984) y Johri (1984) para Asteraceae (Tabla 5), que establecen generalmente una capa de 1 célula de espesor y hasta 10 células de extensión para la familia.

CARACTERES EMBRIOLÓGICOS MASCULINOS				
Para Angiospermas Tobe (1989)	Para Asteraceae (varias subfamilias)			
	Davis(1966)	Pullaiah (1984)	Johri (1984)	Subfamilia Barnadesioideae
Número de filas de iniciales subepidérmicas				
-	-	comúnmente 1, 2, 3 filas en lóbulo abaxial 1 en el lóbulo adaxial.	1	1
Número de células por fila de iniciales subepidérmicas				
-	-	4-10	-	4-7
Tipo de desarrollo de la pared de la antera/Número de capas				
básico, dicotiledóneo, monocotiledón o reducido.	dicotiledóneo	dicotiledóno con tres capas finales: endotecio, capa media y tapete	tres capas: endotecio, capa media y tapete	dicotiledóneo
Tipo de tapete				
periplasmodial o secretor	periplasmodial o secretor	mayormente periplasmodial, excepcionalment e secretor	periplasmodial o secretor	periplasmodial o secretor
Número de núcleos en las células del tapete				

1, 2 o mas	Células multinucleadas que recuperan la condición unicelular por fisión	2, 4 o multinucleado, (tapete periplasmodial). 2-4 nucleado o poliploide (por fusión de núcleos cuando secretor)	2, 4, o 12- nucleadas o debido a fusión poliploides	1, 2
Número de filas de tejido esporógeno				
-	-	1, 2, 4 o más (masa de células moderadamente extensiva)	-	-
Número de divisiones mitóticas de las esporógenas primarias				
-	-	varias, unas pocas o ninguna división (en muy pocos casos).	-	varias
Citocinesis				
simultánea o sucesiva.,	simultánea	mayormente sucesiva, excepcionalment e simultánea	simultánea y sucesiva	simultánea
Tipo de tétradas				
tetraédricas, isobilaterales u otra.,	tetrahédricas, decusadas o isobilaterales	mayormente tetrahédricas o tetrahédricas e isobilaterales. Excepcionalment e decusadas.	tetrahédricas, isobilaterales, decusadas y lineares.	tetrahédricas
Número de esporangios				
2, 4 o más	2, 4	-	-	4
Número de células en el polen maduro				
2, 3	3	3	2, 3	2, 3
Número de lóculos al momento de la dehiscencia				
2, 4	-	-	-	2
Epidermis a la madurez				
persistente o reducida	persistente	-	-	persistente

Capa media				
persistente o efímera	efímera	efímera	-	Efímera
Engrosamientos del endotecio				
con o sin engrosamientos fibrosos	con engrosamientos	-	con engrosamientos., excepcionalmente ausentes	con engrosamientos

Tabla 5. Caracteres embriológicos masculinos para Angiospermas (Tobe, 1989) y Asteraceae (Davis, 1966; Pullaiah, 1984; Johri, 1984).

En las especies analizadas, las arqueósporas son las primeras células en diferenciarse morfológicamente ya que las iniciales subepidérmicas sólo se distinguen por su posición, y en varias especies se observó que ya expresan “diferenciación celular premeiótica” (DCP) antes de que las cuatro capas de la antera estén segregadas (Figs. 28 C, 34 A). Esto puede clasificarse como expresión temprana de DCP. El DCP, su extensión y gradiente se relacionan a mecanismos de selección de células madre de microsporas (Pozner, 2001).

En dos especies analizadas, *Dusenilla patagonica* y *Schlechtendalia luzulifolia*, el gradiente de DCP se vio extendido a células del tapete (Fig. 35 C, 39 C). Estas observaciones concuerdan con las definiciones para esporangiogénesis temprana de Pozner (2001) y que expresan que la visión clásica de linajes celulares, donde la premisa es “mismo origen, mismo destino” y en la que está basada por ejemplo “el tipo de desarrollo Dicotiledóneo de la pared de la antera” establecido por Davis (1966), debería ampliarse y contemplar las observaciones de Pozner (2001) (Figs. 75, 76), aunque Pullaiah (1984), en un intento de simplificar el concepto definió el “tipo de pared Dicotiledóneo” por el número de capas (tres), y no por el linaje u origen.

En un enfoque más actual, Goldberg (1993) incluyó información genética estableciendo tres capas primordiales (L1, L2 y L3), que darían origen a los distintos tejidos durante la fase I o de histodiferenciación (esporangiogénesis) manteniendo el modelo de desarrollo dentro de la premisa “linaje-destino” (Fig. 77). Esta premisa, aunque busca ser exacta es de difícil aplicación.

En cambio, un modelo basado en “diferenciación celular premeiótica” (DCP) interpreta que el destino celular no depende del linaje, sino de la interacción genoma-ambiente y la regulación celular recíproca (Pozner, 2001).

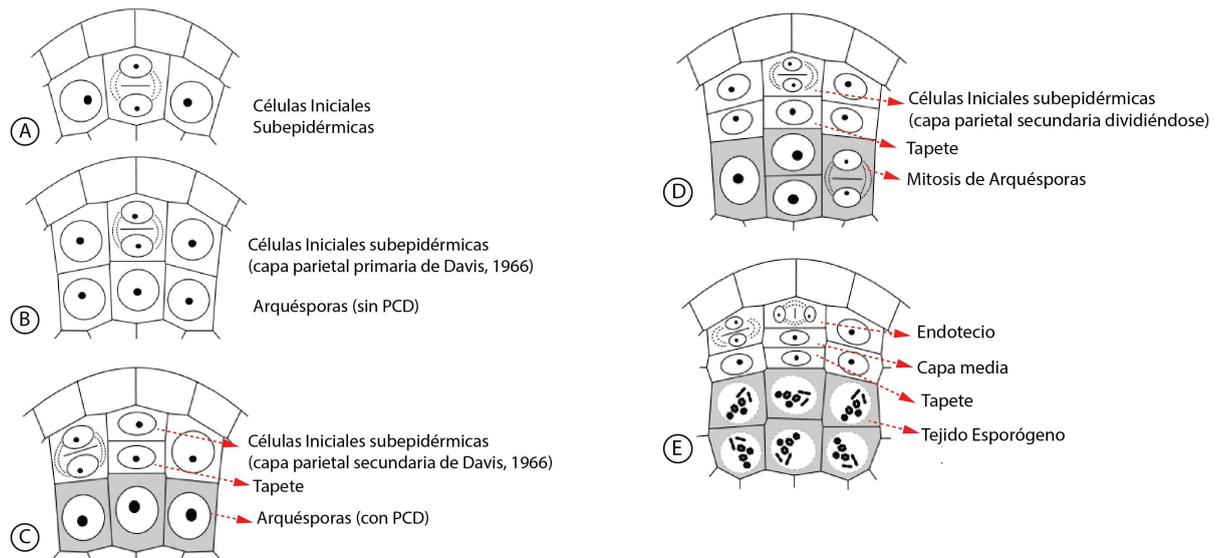


Figura 75. Esquema simplificado de la esporangiogénesis. Segregación de las capas celulares de la antera y diferenciación de las arquésporas y posterior tejido esporógeno. (Pozner, 2001)

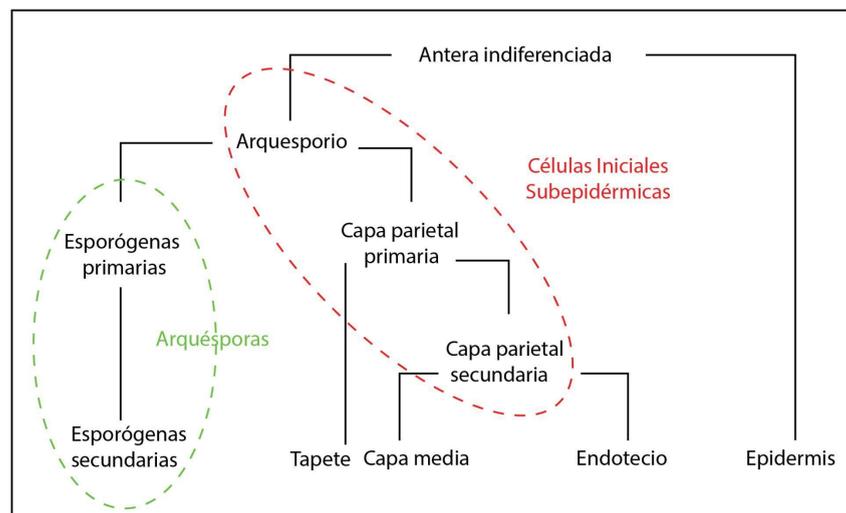


Figura 76. Mapa conceptual simplificado de la Esporangiogénesis. Modelo de Davis (1966) con terminología de Pozner (2001).

Los modelos de Davis (1966), Goldberg (1993) y Pozner (2001) coinciden respecto al origen dual del tapete dónde el tapete interno se origina de la división de células del conectivo, mientras que el externo lo hace normalmente de las divisiones periclinales de las células iniciales subepidérmicas. Este origen dual del tapete, también sería una prueba de la excepción del modelo “linaje-destino” durante el desarrollo esporangial temprano.

El desarrollo de las anteras ha sido dividido en 14 estadios tanto para *Arabidopsis* como para *Oryza sativa* (Zhang *et al.*, 2011) y los genes que regulan este desarrollo han sido estudiados principalmente en estos organismos modelo. Hay varios genes que se involucran en la esporangiogénesis temprana (estadios 1 al 6 de los modelos de Sanders *et al.*, 1999 y Zhang & Wilson, 2009 resumidos en Tabla 6).

Se han identificado varios genes que actúan luego del establecimiento del tapete: el gen *ABORTED MICROSPORE (AMS)* se expresa en el tapete entre los estadios 7 a 9, desde antes de la meiosis y aumenta su expresión luego de pasada ésta. En el mutante *ams* la meiosis ocurre sin embargo falla el desarrollo del polen por degeneración de tapete y microsporas. Éste podría ser el caso de *Doniophyton weddelli*, cuyas flores del radio (femeninas a la madurez) muestran desarrollo de estambres y desarrollo normal de las 4 capas de la antera, incluyendo tejido esporógeno, durante su ontogenia temprana.

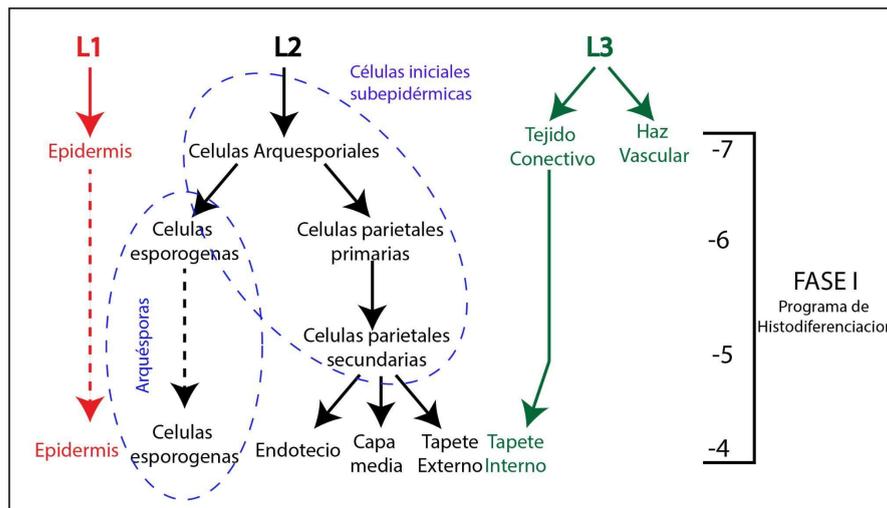


Figura. 77. Mapa conceptual simplificado de la Esporangiógenesis. Modelo de Goldberg (1993). Fase I: Programa de Histodiferenciación de las capas.

ESTADIO	ESTADIOS del desarrollo de anteras en <i>Oryza sativa</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> (Sanders <i>et al.</i> , 1999., Wilson & Zhang 2009)	EVENTOS
ESPORANGIOGÉNESIS	1	Primordio de estambre redondeado con capas germinales L1, L2 y L3
	2	Primordio de estambre se transforma en primordio de antera tetralobulado. L2 forma células arquesporiales (iniciales subepidérmicas)
	3	Las células arquesporiales se dividen y forman la capa parietal primaria
	4	Formación de la capa parietal secundaria y las células esporógenas
	5	Mitosis de las células esporógenas primarias. Capa parietal secundaria forma el endotecio y la capa media. Capa parietal secundaria interna forma el tapete

	6	Pared de la antera con 4 capas. Desarrollo de CMM
MICROESPO ROGÉNESIS	7	Comienzo de la meiosis. Reducción de la capa media
	8	Luego de meiosis II se forma la primexina. Tapete más condensado y vacuolado, comienza la muerte celular programada
	9	Microsporas haploides libres. Tapete con cuerpos de Ubisch
MICROGAME TOGÉNESIS	10	Vacuolización de las microsporas. Tapete más degradado
	11	Primera división mitótica de la microspora. Restos de Tapete
	12	Segunda mitosis. Grano de polen tricelular
	13	Ruptura de septo interlocular
	14	Dehiscencia de la antera

Tabla 6. Estadios del desarrollo de anteras en *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana* (Wilson & Zhang, 2009).

La microsporogénesis y formación de la esporodermis

Según los resultados observados, en varias especies de Barnadesioideae se observan multiplicación de arquésporas, previo a su diferenciación en células madre de las microsporas. Esto coincide con lo expresado por Pullaiah (1984), que la mitosis de arquésporas es común en Asteraceae.

Las arquésporas luego o durante su multiplicación se organizan en filas, en número de dos a cuatro, de tejido arquesporial (“tejido esporógeno” de Pullaiah) lo que también concuerda con lo que Pullaiah (1984) publicó para la familia (una, dos o cuatro filas), aunque este carácter se presenta, según sus observaciones, muy variable, ya que incluye el estado de carácter “masa de células moderadamente extensiva”, en el caso en que las células son muy numerosas y/o no se organizan en filas.

Respecto a la meiosis, se verificaron tétradas tetraédricas, hecho que concuerda con la bibliografía para Asteraceae ya que Pullaiah (1984) establece mayormente tetrahédricas o tetraédricas-isobilaterales, mientras que Davis (1966) asigna también tétradas decusadas y Johri (1984) tétradas lineares. Otro carácter vinculado es la delimitación de microsporas, ya sea simultánea o sucesiva, pero los resultados no arrojan conclusiones firmes y la bibliografía es variada (Tabla 5).

Luego de la meiosis las micrósporas tempranas se liberan individualmente de la envoltura de calosa. En este momento, la segregación o liberación de las microsporas (n), está enmarcado en el comienzo de la segunda fase de Goldberg (1993) denominada Fase II o programa de dehiscencia (Fig. 78).

En términos de morfología del polen, hacia el fin del estadio de tétrada las características principales de la configuración de las aberturas y estructura de la exina ya han sido determinadas. Como se expresa en la bibliografía general para angiospermas, antes de la liberación de las microsporas la primexina se deposita como una capa o estrato homogénea entre la membrana plasmática y la pared de calosa (Fitzgerald & Knox, 1995).

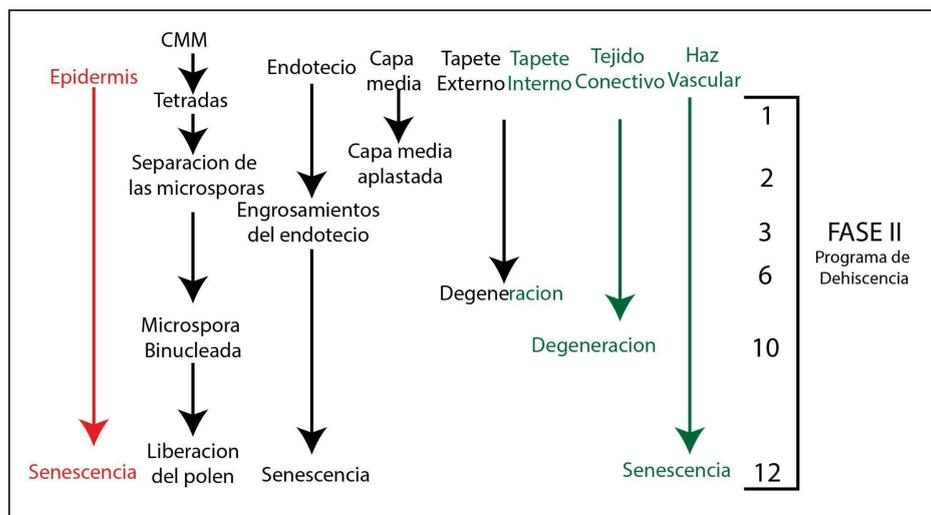


Figura 78. Mapa conceptual simplificado de la microsporogénesis y microgametogénesis. Modelo de Goldberg (1993). Fase II: Programa de dehiscencia.

La primexina actúa como un soporte o plataforma porosa sobre la que los monómeros de esporopolenina pueden polimerizar y está organizada en probáculos y protectum (Sheldon & Dickinson, 1983; Scott, 1994). La parte más externa de la primexina, que corresponderá al tecto, se define primero y acumula esporopolenina, seguido por los elementos infratectales como columelas o infratecto granular y finalmente por la *foot layer* (Blackmore, 2007), pero se debe notar que en las Barnadesioideae esta capa está muy reducida y es discontinua (Tellería *et al.*, 2015). El depósito de la ectexina finaliza hacia la primera mitosis haploide de la micróspora (Prahl *et al.*, 1985; Gubatz *et al.*, 1992; Scott, 1994).

El desarrollo de la ectexina a partir de la primexina ha sido estudiado en Asteraceae en los géneros *Cosmos* (Dickinson & Potter, 1976) y *Helianthus* (Horner & Pearson, 1978).

En las Barnadesioideae estudiadas *Barnadesia odorata*, *Huarpea andina* y *Schlechtendalia luzulifolia* se observaron microsporas con primexina que según las pruebas histoquímicas determinaron una composición principalmente polisacáridica y proteica.

La primexina temprana es susceptible a la acetólisis, mientras que la tardía se hace acetólica resistente -lo que sugiere la adición de esporopolenina-, y se hace progresivamente menos reactiva hasta llegar a la condición inerte característica de la exina madura. Por esta razón la primexina tiñe diferente y la primexina tardía ha sido llamada "protoesporopolenina" según Heslop-Harrison (1968).

Es aceptado que la primexina actúa como un receptor de esporopolenina (Ariizumi *et al.*, 2011). En los taxones estudiados en esta tesis en que se observó la primexina, ésta se depositó formando el patrón de lo que será la estructura final del grano de polen maduro, muy evidenciada sobre todos en las especies con la exina formando lagunas o polen lofado como en *Barnadesia odorata* y *Huarpea andina* (Urtubey, 199; Gamero, 1985). Estas observaciones se ajustan a la hipótesis de que el patrón de ornamentación está determinado por la microspora, y que es necesario para "guiar" a los elementos inertes en su depósito (Heslop-Harrison, 1968; Johri, 1984).

Luego del estadio de tétrada comenzará el depósito de la endexina (Fig. 79), que es sintetizada por la microspora (Johri, 1984), sobre la lamela tripartita (Rowley & Southworth, 1967; Blackmore, 2007). En Barnadesioideae la composición de la endexina se mostró variable presentando, además de esporopolenina, ocasionalmente polisacáridos en *Dasyphyllum brasiliense*, *Doniophyton weddellii* y *Dusenilla patagonica* o polisacáridos y proteínas en *Barnadesia odorata* y *Schlechtendalia luzulifolia*. Esto coincide con Southworth (1973) y Johri (1984) que establecen que la endexina es la capa más variable en composición, ya que será intermedia entre ectexina e intina, y sus propiedades de coloración son diferentes a la ectexina y la foot layer (Heslop-Harrison, 1968). La endexina, en angiospermas, muestra un amplio rango de diversidad estructural, puede ser continua o discontinua, estar restringida a las aberturas o completamente ausente. Una característica morfológica es su espesor creciente hacia las aberturas y puede ser compacta, esponjosa o lamelar (Weber & Ulrich, 2010). Estudios de su ultraestructura revelan que se compone de capas homogéneas y granulares alternas (Polevova, 2019).

En *Helianthus annuus* L., la endexina también posee reacción positiva al Azul de Anilina y PAS (Horner & Pearson, 1978), lo que indica que su naturaleza química es diferente en Asteraceae.

Tanto ectexina como endexina poseen esporopolenina como constituyente principal, evidenciado por los tests de compuestos lipídicos (Auramina O, Rojo Neutro, Sudán Black), pero la endexina no responde a la tinción de los lípidos con Fucsina básica. Además de esporopolenina la endexina también posee hemicelulosas, confirmado por las coloraciones con Azul de Astra. También tiñe de color azulado con Azul de Toluidina lo que indica la presencia de grupos polianiónicos (Dettke & Pires dos Santos, 2011).

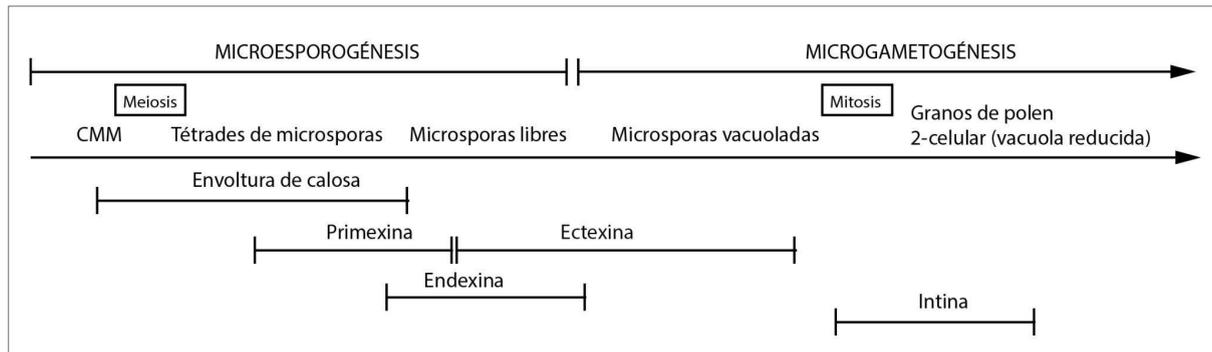


Figura 79. Esquema simplificado de la cronología de desarrollo de las capas de la esporodermis

Varios estudios comprueban que la endexina es un estrato elástico con importantes funciones en los procesos de deshidratación e hidratación del grano de polen (Hesse, 2000).

Debido a que la esporopolenina es altamente insoluble, resistente a la degradación y excepcionalmente estable (Ahlers *et al.*, 2003) la naturaleza bioquímica de la exina polínica ha sido difícil de conocer. El modelo clásico establece un eje principal de carotenoides polimerizados y estudios posteriores resaltaron la participación de compuestos fenólicos y alifáticos polihidroxilados (Quilinchini *et al.*, 2015).

En *Huarpea andina* la densidad de esporopolenina decrece centrípetamente haciendo a la ectexina más reactiva a la prueba para proteínas (Azul de Comassie) asemejándose a la reactividad observada para la endexina (Figs. 37 F, 38 A). Esto coincide con la hipótesis de que durante la maduración de la exina el material va perdiendo su reactividad, y se hace progresivamente más inerte (Heslop-Harrison, 1968), lo que podría indicar que la ectexina va concentrando material esporopoleninico en forma centrípeta, por lo que las secciones internas serían las últimas en impregnarse. Las especies de polen psilolofados como *Barnadesia odorata* y *Huarpea andina* mostraron una ectexina más reactiva a la prueba para proteínas en el estado de micróspora vacuolada temprana, cuando aún el grosor de la ectexina no es el definitivo y la densidad de la esporopolenina es menor.

La intina es la última capa en formarse, (Heslop-Harrison, 1968) y es positiva para las pruebas de PAS y proteínas. Su rol es formar la pared de las aberturas germinales que carecen de ectexina, y es en este punto donde alcanza su mayor complejidad (Heslop-Harrison *et al.*, 1973). En estas áreas la célula vegetativa protruye y se pone en contacto con el exterior. En todos los taxones estudiados se observó que, en el grano de polen bicelular, en las zonas colporales se desarrolla un patrón trilaminar que consta de intina y endexina engrosadas, a veces impregnadas de sustancias pécticas y un tapón de sustancias pécticas y proteicas que podrían ser productos que rezuman desde estas capas.

Otras observaciones sobre la morfología polínica (escultura y estructura) de los taxones analizados confirman los estudios previos al respecto (Urtubey *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000; Blackmore *et al.*, 2010; Telleria *et al.*, 2015).

Aunque es tradicionalmente aceptado que los componentes de la esporopolenina son otorgados por el tapete existe desconocimiento en cuanto a la contribución gametofítica en la producción de esporopolenina (Quilinchini *et al.*, 2015). Algunos de los genes que codifican para enzimas o proteínas involucradas en la síntesis de esporopolenina parecen tener una expresión dual tanto en el tapete como en las microsporas (Morant *et al.*, 2007) y muchos modelos mantienen que la microspora secreta componentes esporopolenínicos (Wallace *et al.*, 2011).

El tapete

La actividad del tapete, incluyendo su formación, punto cúlmine de actividad, declinación y desintegración, sucede durante un lapso prolongado de tiempo acompañando los cambios que sufre el tejido esporógeno durante la esporangiogénesis, microsporogénesis y microgametogénesis. Como definición general el tapete es un tejido nutritivo, transitorio, apoptótico de naturaleza secretora, que persiste durante toda la histodiferenciación y etapa media del desarrollo de la antera (Figs. 77 y 78) y degenerará por muerte celular programada (MCP) tras haber alcanzado su punto cúlmine de desarrollo es decir al finalizar la síntesis de esporopolenina en la microgametogénesis temprana, entre la etapa de microspora vacuolada y la primera mitosis haploide (Sanders *et al.*, 1999). Tiene principalmente un rol nutritivo para las microsporas pero también se han sugerido otras funciones como: síntesis de calasa para disolver la pared calósica., formación de precursores de esporopolenina, formación de Pollenkitt, y formación de fluido locular (Pacini *et al.*, 1985).

En *Barnadesia odorata.*, *Dasyphyllum brasiliense.*, *Doniophyton weddellii.*, *Dusenilla patagonica*, *Huarpea andina* y *Schlechtendalia luzulifolia* se observaron tapetes con células binucleadas en la etapa de células madre de las microsporas (microsporogénesis) y en etapas posteriores, previamente a su desintegración. Las células del tapete se distinguen de acuerdo con el número de núcleos, carácter que puede cambiar numerosas veces durante el desarrollo (Pacini, 1997). Las células del tapete se mantuvieron de mayor tamaño con citoplasma denso, ausencia de vacuola y ocasionalmente binucleadas durante toda la fase de histodiferenciación. En especies de otras subfamilias de Asteraceae, las células del tapete pueden ser 2, 4 o hasta 12-nucleadas, como en *Erigeron bonariensis* (Pullaiah, 1984).

En las especies de Barnadesioideae aquí estudiadas, se observaron los dos tipos principales de tapete es decir periplasmoidal y secretor, clasificación basada en la estructura

celular y la relación con las microsporas, aunque las funciones de ambos tipos de tapete son esencialmente las mismas (Pacini, 1997).

Como se discutió anteriormente, el tapete surge tempranamente durante la esporangiogénesis y clásicamente se le asignaba un origen parietal (Davis, 1966). Otros autores sugieren un origen doble del tapete, es decir, células provenientes tanto de la capa parietal como del tejido conectivo de la zona interna de los lóculos, ya que en el interior no hay endotecio ni epidermis y el tapete está en contacto directo con el tejido conectivo (Periasamy & Swamy, 1966). De acuerdo a las observaciones de esta tesis, y en concordancia con esta hipótesis, durante la segregación de las cuatro capas de la antera pudo observarse que la arquitectura concéntrica de las capas, con sólo una fila de células, siempre está mantenida hacia el exterior de los lóculos pero hacia el interior está interrumpida y algunas células del tapete se reiteran con una o dos células adicionales ubicándose en una segunda fila o una sola célula ubicándose en forma de cuña entre dos de la fila única como lo ilustra *Barnadesia odorata* (Fig 23 A). Estas anomalías en el ordenamiento de las células podrían ser una evidencia de un origen distinto de aquellas células del tapete adyacentes al tejido conectivo.

Otros estudios también sugieren que éstas podrían provenir de tejido arqueosporico periférico que habiendo expresado una diferenciación celular premeiótica (DCP) no entra en meiosis sino que se diferencia finalmente en tapete (Bhandari, 1971; Pozner, 2001)

El desarrollo y diferenciación del tapete son críticos para la producción de la generación masculina temprana, sin embargo, durante el desarrollo tardío del polen, la desintegración del tapete, promovida por procesos de apoptosis, es también crucial para formar polen viable (Li *et al.*, 2006; Aya *et al.*, 2009).

La importancia de la muerte celular programada (MCP) del tapete para el desarrollo normal del polen ha sido destacada en estudios donde mutantes masculinos estériles fallan en llevar a término la desintegración de este tejido (Parish & Li, 2010). La MCP del tapete también juega un papel importante en la liberación del polen a través de la ruptura del septo interocular y formación del estomio (Wilson *et al.*, 2011) como se discutirá más adelante.

En aquellas especies que mostraron tapete de tipo secretor como *Barnadesia odorata* y *Duseniella patagonica*, las células mantuvieron su individualidad y los contenidos celulares fueron progresivamente secretados hacia el lóculo de la antera vía vesículas especializadas (cuerpos de Ubisch). Se observaron cuerpos de Ubisch de 2 μm adheridos a la exina en la etapa de grano de polen binucleado en *Barnadesia odorata* y de tamaño menor en la etapa de microspora vacuolada en *Duseniella patagonica*. De acuerdo con la bibliografía, los cuerpos de Ubisch pueden ser variables en forma y tamaño oscilan entre 0,14 y 15 μm , aunque en general promedian los 5 μm de diámetro y están formados por un centro llamado proorbículo y una pared cuya composición química tiene polisacáridos ácidos, proteínas,

lípidos insaturados y compuestos fenólicos (Clement & Audran, 1993). Por lo tanto, los cuerpos de Ubisch observados estarían dentro de los parámetros normales de tamaño.

En el tapete secretor las células están polarizadas tanto en estructura como función, mientras que no es así en el tapete periplasmodial (Pacini *et al.*, 1985). Las paredes tangenciales internas y externas del tapete secretor difieren en su capacidad de secreción, ya que se establece un gradiente desde los márgenes del lóculo hacia el interior, donde están las microsporas. Esto se refleja en los resultados de esta tesis donde en varias de las especies estudiadas el tapete exhibe características morfológicas que coinciden con este “síndrome de polarización” (Pacini *et al.*, 1985) principalmente las evaginaciones citoplasmáticas en las paredes tangenciales internas de las células del tapete que multiplican el área superficial de membrana plasmática y pared probablemente para secretar sustancias en grandes cantidades, como se observó en *Barnadesia. odorata* (Fig. 23 D) y *Duseniella patagonica* (Fig. 35 D).

El tapete de tipo periplasmodial observado en *Dasyphyllum brasiliense*, *Doniophyton weddellii* y *Huarpea andina* muestra la pérdida de la arquitectura celular, las células se superponen y protruyen hacia interior del lóculo ubicándose entre microsporas, cambian su forma desde cuadrangulares hacia formas más lobulares y redondeadas, pierden sus límites individuales primero por interdigitación de sus paredes anticlinales y luego por su desintegración y su citoplasma se vacuoliza para formar finalmente el sincicio o periplasmodio en el centro del lóculo (Figs. 29 H, 32 E, 37 H).

Las células del tapete periplasmodial no muestran polaridad como en el tapete secretor, pero si una morfología que permite diagnosticar la formación del sincicio. La característica más evidente es la formación de interdigitaciones en las paredes anticlinales (radiales) entre las células contiguas como se observó en *Huarpea andina*.

Schlechtendalia luzulifolia, mostró un tapete periplasmodial en la etapa de microspora libre con primexina, pero también se pudieron observar cuerpos de Ubisch y membrana peritapetal en la misma etapa, por lo que la asignación a un tipo específico no es posible o sería un caso en que ambos tipos de tapete coexisten. Especies con ambos tipos de tapete coexistiendo, se han mencionado en la literatura para la tribu Astereae (Ao *et al.*, 2009).

El tapete secretor también está presente en grupos cercanos a Barnadesioideae como en las subfamilias basales, Stifftioideae y Wunderlichioideae, también en familias cercanas como Goodeniaceae y Calyceraceae (Bonifacio *et al.*, 2018). Filogenéticamente, el tapete secretor es considerado como un carácter plesiomórfico en Asteraceae, cambiando a la condición de periplasmodial como en las Mutisioideas (Maheswari Devi, 1957), Cichorioideas (Ahlstrand, 1985) y Asteroideas (Venkateswarlu & Maheswari Devi, 1955; Maheswari Devi, 1963; Davis, 1962; Sundara Rajan, 1968; Sharma & Murty, 1978; Pullaiah, 1978, 1979, 1981, 1983; Lakshmi & Pullaiah, 1986; Gotelli *et al.*, 2008). La distinción entre

los dos tipos de tapete se ha hecho menos evidente reconociéndose muchos subtipos. Se cree que el tapete secretor es el tipo más primitivo, a partir del cual han evolucionado los demás tendiendo a una nutrición más eficiente (Pacini *et al.*, 1985).

Sin embargo, en la subfamilia basal de la compuestas, Barnadesioideae se observaron ambos tipos de tapete y en *Schlechtendalia luzulifolia* ambos tapetes ocurren simultáneamente.

Sustancias de reserva: hidratos de carbono

Las sustancias de reserva en el grano de polen maduro han sido objeto de numerosos estudios y de acuerdo con los autores tienen un significado ecofisiológico amplio involucrando el síndrome de polinización, el grado de hidratación, la resistencia a la desecación, y la germinación del tubo polínico (Franchi *et al.*, 1996) y también con el tamaño del grano de polen (Endress, 1994). Los polisacáridos además de su rol como reserva, tienen una función estructural ya que formarán parte de los engrosamientos de endotecio, primexina e intina así como los lípidos en la formación de la exina (Santos de Oliveira *et al.*, 2015).

En los granos de polen de las especies de Barnadesioideae analizadas se encontraron reservas de hidratos de carbono en forma de glúcidos solubles y granos de almidón (granos de polen *starchy*).

Baker & Baker (1979) clasificaron al polen maduro en *starchy* o *starchless* basándose en la presencia/ausencia de granos de almidón. Por otro lado en un estudio realizado sobre 900 especies de Angiospermas se observó que todos los taxones sintetizan amiloplastos al menos una vez durante su desarrollo (Franchi *et al.*, 1996).

De acuerdo con Franchi *et al.* (1996) los granos de polen pueden clasificarse según sus reservas de almidón sean hidrolizadas antes o después de la dehiscencia en forma total o parcial (Tabla 7). Según esta hipótesis, cuando hay escasa cantidad de granos de almidón durante la dehiscencia, es porque éstos han sido hidrolizados y vehiculizados hacia otras funciones o destinos posibles como ser consumidos inmediatamente, polimerizados para formar la intina o disueltos en el citoplasma en forma de glúcidos solubles (Pacini & Franchi, 1983; Clement & Audran, 1995).

Tipos de Reservas de Almidón		Especies
Previo a la dehiscencia	Durante la dehiscencia	

Almidón no hidrolizado	Granos de almidón Citoplasma PAS positivo	<i>Chuquiraga jussieui</i> <i>Dasyphyllum brasiliense</i> <i>Doniophyton weddellii</i>
Almidón total o parcialmente hidrolizado	Almidón totalmente hidrolizado. Citoplasma PAS positivo	<i>Doniophyton anomalum</i> <i>Schlechtendalia luzulifolia</i> <i>Barnadesia odorata</i> <i>Huarpea andina</i>
	Almidón parcialmente hidrolizado. Granos de almidón y citoplasma PAS positivo	<i>Chuquiraga aurea</i> <i>Chuquiraga parviflora</i> <i>Duseniella patagonica</i>

Tabla 7. Polen maduro en Barnadesioideae según el tipo de reserva de polisacáridos (Franchi *et al.*, 1996).

Estudios experimentales han demostrado que la hidrólisis del almidón lleva a la formación de sacarosa, fructosa, glucosa, pectina y otros oligosacáridos que protegen las membranas celulares durante la desecación previa y posterior a la antesis (Hoekstra *et al.*, 1989; Aouali *et al.*, 2001) y que estos cambios pueden ser activados por oscilaciones en la humedad relativa ambiente (Guarnieri *et al.*, 2006).

Otros estudios establecen que pueden ocurrir uno o dos ciclos de amilolisis y amilogénesis durante todo el desarrollo de las microsporas/granos de polen (Pacini *et al.*, 2006) y que estos ciclos pueden prolongarse durante varios estados de la ontogenia.

Se puede entender que el mayor o menor contenido de almidón en los granos de polen maduros depende de la etapa de amilosis-amilogénesis en que se encuentran al momento de la dehiscencia de las anteras. Por lo tanto, en el momento en que la acumulación de granos de almidón es máxima como se vió en *Chuquiraga jussieui*, *Dasyphyllum brasiliense* y *Doniophyton weddellii* el ciclo de amilogénesis había llegado a su clímax, mientras que aquellas especies que presentaron granos de almidón escasos como se observó en *Chuquiraga aurea*, *Chuquiraga parviflora* y *Duseniella patagonica* estaban en un momento intermedio del ciclo.

La presencia de amiloplastos puede tener un significado ecológico al relacionarse al síndrome de polinización o a la resistencia a la desecación (Nepi *et al.*, 2001). Estudios estadísticos de granos de polen en más de 1000 especies de Angiospermas han demostrado que los granos de polen entomófilos tienden a acumular más lípidos de reserva,

mientras que los anemófilos tienden a acumular granos de almidón (Calvino, 1952; Stanley & Linskens, 1974; Baker & Baker, 1979). Los trabajos de Baker & Baker (1979, 1982, 1983) proponen que las especies polinizadas por himenópteros y dípteros, es decir entomófilas, producen polen *starchless* y que las polinizadas por lepidópteros y aves, es decir enfingófilas y ornitófilas producen polen *starchy*.

Los estudios de biología floral en Barnadesioideae realizados hasta el momento establecen que hay especies con el síndrome de polinización ornitófilo como en el estudio de Galetto (1995) en *Barnadesia odorata* y Vogel (2015) en *Arnaldoa macbrideana*, *B. rosea*, *B. spinosa*, *Chuquiraga calchaquina*, *C. jussieui* y *Fulcaldea stuessyi*. Estudios realizados en el género *Chuquiraga*, sección *Chuquiraga* serie *Chuquiraga*, cuyas especies presentan capítulos de más de 3 cm de largo, se corresponden con el síndrome de polinización ornitófilo, que podría haber surgido como una adaptación a la polinización por colibríes de altura ya que componen parte de la flora de los bosques y páramo andino. Mientras que las especies de la sección *Acanthophylla*, de capítulos medianos a pequeños, presentan el síndrome de polinización entomófilo (Ezcurra, 1985, 2002).

La presente investigación en especies de *Chuquiraga* concuerda con lo publicado hasta el momento ya que *Chuquiraga jussieui* de la sección *Chuquiraga*, se encuadra en el síndrome ornitófilo, por la morfología de sus capítulos y por el polen de tipo *starchy*, mientras que *Chuquiraga aurea* de la sección *Acanthophylla*, con capítulos pequeños y con polen de tipo *starchless*, se corresponde al síndrome de polinización entomófilo y los polinizadores serían lepidópteros. Finalmente *C. parviflora* (sección *Chuquiraga*), con capítulos pequeños y granos de polen de tipo *starchless*, se adecua al síndrome de polinización entomófilo.

Respecto al género *Dasyphyllum*, la única especie analizada en esta tesis, *D. brasiliense* var. *brasiliense*, posee polen de tipo *starchy*, y podría corresponder a un síndrome ornitófilo o esfingófilo ya que según Baker & Baker (1979) las especies con granos de polen *starchy* también son polinizadas por lepidópteros.

Es escasa la bibliografía sobre la biología floral e interacción con polinizadores en *Dasyphyllum* excepto para *D. latifolium*, *D. sprengelianum* y *D. cryptocephalum*, a las cuales se le asignó el síndrome de polinización por murciélagos (Vogel, 2015), y no hay especificaciones sobre el tipo de reservas del grano de polen. De acuerdo con estudios estadísticos de biología floral puede existir una superposición entre los síndromes de polinización ornitófila y quiropterófila (Muchala, 2003).

Aunque para *Barnadesia odorata* se describen nectarios en las flores centrales y se le asigna polinización esfingófila por mariposas nocturnas (Galetto, 1995), mis observaciones sobre *B. odorata* y *Huarpea andina* permitieron identificar granos de polen tipo *starchless*, lo que no se corresponde con la clasificación de Baker & Baker (1979) (polinizadas por himenópteros y dípteros).

Según Gruenstaeudl y coautores (2009) la condición ancestral en Barnadesioideae es la polinización por insectos, al igual que su grupo hermano las Calyceraceae (DeVore, 1994) y dentro de la subfamilia al menos tres cambios independientes de polinización entomófila a ornitófila habrían ocurrido en los géneros *Barnadesia*, *Chuquiraga* y *Arnaldoa*.

Sustancias de reserva: lípidos

Aunque los resultados de esta tesis respecto a la presencia de lípidos en los granos de polen maduros son parciales, se ha observado reiteradamente la presencia de vesículas no reactivas a la prueba de hidratos de carbono total ni de proteínas, por lo cual se puede inferir que sean lípidos cuya composición ha sido alterada durante los procesos de fijación. En todas las especies se han observado estas vesículas, así como, amiloplastos y glúcidos solubles.

La presencia de grandes cantidades de cuerpos lipídicos como reserva en los granos de polen ha sido ampliamente demostrada por estudios ultraestructurales. (van Went, 1974; Evans *et al.*, 1991; Wetzel & Jensen, 1992). Esta acumulación en los granos de polen comienza luego de la primera mitosis haploide y coincide con una rápida proliferación de citoplasma para ocupar la mayor parte de la célula vegetativa (Evans *et al.*, 1992; Owen & Makaroff, 1995; Piffanelli *et al.*, 1997). El tamaño suele estar en el rango de los 0,5-2 μm diám. (Piffanelli *et al.*, 1998).

En dos especies analizadas *Chuquiraga aurea* y *C. parviflora*, se observaron vesículas excepcionalmente grandes que alcanzan los 5 μm diám (probables cuerpos lipídicos) mientras que en el resto de los taxones alcanzan hasta 3 μm diám. En todos los taxones se detectaron finas membranas de proteínas alrededor de estas vesículas que según la bibliografía podrían ser fosfolípidos de membrana asociados ya que las reservas de lípidos se pueden encontrar como extensos sistemas de membranas (Piffanelli *et al.*, 1998) rodeados por una capa única de fosfolípidos con proteínas específicas incrustadas (Murphy, 2001; Hsieh & Huang, 2004) que pueden tener una función protectora durante la deshidratación/rehidratación del polen para evitar la coalescencia de cuerpos entre sí (Murphy, 1993; Huang, 1996; Wetzel & Jensen, 1992; Van Aelst *et al.*, 1993; Piffanelli *et al.*, 1997).

Las reservas lipídicas, cuyo destino final es ser consumidos durante el desarrollo del tubo polínico y la germinación, pueden originarse a partir de la hidrólisis del almidón (Pacini & Juniper, 1984). También el tejido tapetal es almacenador de sustancias lipídicas, que posteriormente serán usadas en la síntesis de la esporopolenina y pollenkit. También en los tejidos esporofíticos se produce almacenamiento de sustancias en distintas etapas de la ontogenia, por ejemplo, el conectivo del estambre actúa como un buffer de sustancias de

reserva, sintetizando y almacenando en caso de stress hídrico, o de disponibilidad oportuna de azúcares (Clement & Audran, 1995).

Número de células del grano de polen al momento de la dehiscencia

Los resultados obtenidos muestran que las Barnadesioideae incluyen tanto especies con polen 2-celular como también con polen 3-celular en el momento de la dehiscencia de las anteras (Fig. 20). El número de células por grano de polen al momento de la dispersión es un carácter estable en Angiospermas, que siempre presentan polen 2-3 celular (Johri, 1984).

Mientras que el polen 2-celular está en estado quiescente y tiene un período de latencia más largo, características que son ventajosas en un ambiente donde la polinización es de baja eficiencia, las ventajas adaptativas de una germinación rápida sólo son útiles cuando la polinización es eficiente por lo que el polen 3-celular parece estar favorecido a nichos específicos. La primera mitosis de la microspora varía ampliamente, ocurriendo rápidamente en aquellas especies cuyo desarrollo es rápido (especies tropicales), sin embargo, en plantas boreales, donde la iniciación floral y la meiosis ocurren el otoño anterior, las microsporas pueden permanecer en estado unicelular durante el invierno. La mitosis de la célula gametogénica, puede suceder tempranamente o no hasta la germinación del grano de polen, aunque la profase I puede iniciarse antes de este momento. En otros casos la mitosis puede ocurrir cuando el grano se deposita en el estigma, durante la fase de hidratación por lo que existe una correlación entre estas condiciones (Tabla 8) (Richards, 1997).

La citología del polen en el momento de la dehiscencia puede correlacionarse con un cierto número de características fisiológicas del grano de polen como la viabilidad, almacenamiento y germinación *in vitro* (Tabla 8). En general el polen 2-celular muestra una viabilidad mayor, buen almacenamiento y posibilidad de germinar en un medio simple bajo condiciones *in vitro*, comparado con el polen 3-celular. Además, puede relacionarse con el tipo de sistema reproductivo así las especies con polen 2-celular muestran un tipo autoincompatibilidad gametofítica, donde el polen incompatible puede germinar exitosamente en el estigma y abrirse paso hasta el estilo donde es finalmente inhibido (o no) su crecimiento, mientras que en el polen 3-celular la autoincompatibilidad es esporofítica, es decir que si el crecimiento del tubo polínico es inhibido, ocurre inmediatamente en la superficie estigmática (Shivanna, 2014).

La mayoría de Asteraceae son autoincompatibles esporofíticas aunque la incompatibilidad no es absoluta. En los sistemas esporofíticos el control del comportamiento del grano de polen viene de la antera que le dio origen y no del grano mismo. Una revisión en detalle de la distribución de los sistemas de autoincompatibilidad esporofítica en Asteraceae estimó

que el 63% pertenecen a este sistema, mientras que en las especies restantes existe una mezcla de pseudo autoincompatibilidad (10%) y autocompatibilidad (27%). Ferrer & Good-Avila (2007) sostienen que el alto porcentaje de especies con autoincompatibilidad sugiere que este sería el sistema reproductivo ancestral en la familia aunque la evidencia filogenética para esta aseveración no es concluyente.

Caracteres	Tipo de autoincompatibilidad	
	Gametofítico	Esporofítico
Grano de polen	2-celular	3-celular
Tasa de Respiración	baja	alta
Viabilidad	larga	corta
Crecimiento in vitro	fácil	difícil
Estigma, tipo	húmedo (con exudado)	seco
Hidratación del polen	externa	interna
Penetración del tubo	intercelular	intracelular
Tubo polínico. Lugar de inhibición cuando es incompatible	estilo	estigma
Deposición de calosa en polen incompatible	intina	exina
Ocurrencia Taxonómica	Leguminosae Poaceae	Brassicaceae Asteraceae

Tabla 8. Características morfológicas y fisiológicas de los sistemas gametofíticos y esporofíticos multialélicos. (Richards, 1997).

Mecanismo de dehiscencia de las anteras: el endotecio y el tejido conectivo

En el inicio de la microgametogénesis comienzan los cambios que preparan a los tejidos involucrados en la dehiscencia de las anteras. Estos cambios son: el aumento de tamaño de las células del endotecio, que adquieren forma cuadrangular, la aparición de engrosamientos fibrosos en el endotecio y el tejido conectivo y la cutinización de las epidermis.

Contrariamente a otras familias de angiospermas, cuyas células endotenciales son cuboidales (Manning, 1996), el endotecio de Asteraceae está formado por una capa de células rectangulares, con su eje mayor paralelo al eje de las anteras (Dormer, 1962).

La diferenciación del endotecio, implica dos procesos: el establecimiento de la forma rectangular de sus células mediante la vacuolización y expansión, y la aparición de los engrosamientos.

De acuerdo con los resultados, las especies analizadas tienen tres tipos de engrosamientos: 1-transversales en forma de barras yuxtapuestas, mencionado por Dormer (1962) como una tendencia en la familia, 2-transversales inclinados, y 3- longitudinales. Estas observaciones estarían de acuerdo con el trabajo más reciente sobre caracteres estaminales en la subfamilia Barnadesioideae (Svoma *et al.*, 2019), donde se observó que todos los géneros de Barnadesioideae poseen células endoteciales con engrosamientos radiales y menos comúnmente engrosamientos longitudinales y oblicuos (*Dasyphyllum* y *Archidasyphyllum*), y con otros trabajos anteriores que establecen engrosamientos en barras radiales o *ridge like* para *Arnaldoa macbrideana* (Erbar & Leins 2000) y longitudinales (*Barnadesia*, *Huarpea*, (Bremer 1994))

El endotecio no trabaja aisladamente en la dehiscencia de la antera, sino que forma un complejo con el tejido conectivo. El complejo endotecio-tejido conectivo se diferencia en una estructura rígida representada por el tejido conectivo con una porción móvil o endotecio, cuya cinemática será determinada por la orientación y forma de los engrosamientos. Los engrosamientos secundarios del endotecio son esenciales para otorgar la fuerza mecánica para la dehiscencia de la antera (Keijzer, 1987; Bonner and Dickinson, 1990).

En todos los taxones analizados el endotecio y la epidermis son persistentes durante la dehiscencia y están más engrosadas en los lóculos externos. Sin embargo, en Asteraceae puede haber especies que solo mantengan el endotecio y no la epidermis (Yankova-Tsvetkova *et al.*, 2016).

Todas las especies estudiadas se corresponden con los caracteres generales para Asteraceae, es decir, la dehiscencia es longitudinal e introrsa. En general el proceso de dehiscencia es similar en muchas especies con diferencias sutiles en la estructura de las anteras y los tipos de engrosamiento del endotecio (Carrizo Garcia, 2002; Wilson *et al.*, 2011).

De acuerdo con los resultados, todas las especies estudiadas tienen el tejido conectivo con engrosamientos conspicuos, excepto en *Schlechtendalia luzulifolia* que están dispuestos en anillos transversales o en barras longitudinales. También, en estas especies, se identificó lo que otros autores como Hufford & Endress (1989) y Carrizo García (2008) han denominado "hipodermis conectiva", es decir, células de tipo endotecial que se continúan con el endotecio de cada teca a lo largo de las superficies dorsal y ventral de la antera. En Barnadesioideae, la hipodermis es dorsal y tiene una única capa de células de espesor, de posición hipodérmica o subepidérmica y puede ser continua como en *Huarpea andina* o interrumpida en la zona del tejido vascular en el resto de las especies estudiadas. Esta

hipodermis conectiva, está menos engrosada que las células epidérmicas suprayacentes, pero más engrosada que el tejido conectivo y el endotecio adyacentes, y sería una transición entre los tres tipos de tejidos.

Tanto el tejido conectivo engrosado como la hipodermis conectiva participan activamente en la dehiscencia de las anteras, ya que proporcionan la porción inmóvil que dará anclaje y sostén a toda la estructura y colaboran en la apertura de las anteras.

Para lograr la dehiscencia de las anteras y la liberación del polen, además de los cambios celulares requeridos (diferenciación y degradación), es necesario que sucedan cambios en el estatus hídrico tanto de las anteras como de órganos adyacentes (Scott, 2004).

Estudios comparativos sugieren un modelo en que el estatus hídrico del endotecio contribuye al proceso de dehiscencia en dos pasos, uno antes de la dehiscencia, al mismo tiempo que ocurre lisis de las células periestomiales, el endotecio y la epidermis se vuelven turgentes lo que genera junto con el aumento en volumen de los granos de polen una presión centrípeta que colabora con la ruptura del septo interocular y luego del estomio. Esto concuerda con los resultados observados en Barnadesioideae, donde, durante la dehiscencia, los granos de polen se observan turgentes y con la célula sifonogénica protruyendo por los colporos.

En un segundo momento los tejidos, que antes estaban turgentes, experimentan desecación lo que genera una contracción diferencial y por ende una flexión hacia afuera que conduce a la retracción de la pared y apertura total del estomio (Keijzer, 1987).

Al observar la mecánica de la anthesis, se hace evidente que el tejido conectivo cumple un rol fundamental, ya que al estar densamente engrosado proporciona el eje rígido sobre el cual se desplazarán las porciones móviles (pared de los lóculos). Los lóculos internos están menos reforzados por engrosamientos, por lo que sufren el mayor movimiento en algunos casos llegando a quedar yuxtapuestos y perpendiculares al eje mayor como en *Chuquiraga aurea* y *Schlechtendalia luzulifolia*.

Uno de los mecanismos sugeridos para lograr la deshidratación de los tejidos ha sido el agotamiento de almidón del tejido conectivo que rodea al haz vascular. La conversión de almidón en azúcar simple incrementa el potencial osmótico. Entonces el tejido conectivo tiene importancia como sitio del proceso activo de deshidratación para modificar el potencial osmótico y así producir las condiciones finales necesarias para la apertura de las anteras (Bonner & Dickinson, 1990) aunque en las especies estudiadas no se detectó almidón en dicho tejido. Experimentos en anteras estériles de tabaco comprueban que ante la ausencia de tapete y polen, las anteras pueden experimentar dehiscencia normalmente, lo que sugiere que la dehiscencia no requiere de estos tejidos (Goldberg *et al.*, 1993).

Usualmente, la dehiscencia de las anteras se interpreta sobre la base de la función mecánica del endotecio, de manera general y sin mayores detalles. Sin embargo, el

mecanismo de dehiscencia puede ser variable y pueden intervenir otros tejidos, como la epidermis (Pozner & Cocucci, 2006), e involucrar diferentes patrones de movimiento de la pared de las anteras, especialmente cuando las anteras están reunidas en diferentes tipos de sinantéreos (Pozner, 1993). Los resultados de esta tesis revelan hasta el momento para Barnadesioideae que la dehiscencia de las anteras es un fenómeno complejo, que involucra no sólo al endotecio sino además a la epidermis del conectivo y las capas celulares más profundas. Además, el endotecio de los lóculos externos presenta engrosamientos y una mecánica diferente al de los lóculos internos. Esta complejidad estructural y funcional de la dehiscencia de las anteras puede asociarse a las limitaciones de movimiento y de espacio que son consecuencia de la estructura del sinantéreo. De modo que el mecanismo de presentación secundaria del polen de estas plantas, no sólo involucra una asociación de las anteras en forma de anillo y la coordinación de su dehiscencia con el crecimiento del estilo y la estructura del estigma, sino también el desarrollo de una estructura de las capas mecánicas de las anteras y un mecanismo de dehiscencia especial para que el polen pueda ser liberado al interior del sinantéreo.

5.3 Desarrollo de ovarios, óvulos y semillas

Los resultados del análisis de los óvulos coinciden con los publicado hasta el momento para la generalidad observada en la familia Asteraceae: la presencia de un único óvulo anátropo, unitegumentado y tenuinucelado (Johri *et al.*, 1992), aunque no pudo establecerse el número de capas iniciales intervinientes en el desarrollo del mismo, pero con el nucelo de tipo tenuinucelado incompleto, al igual que lo conocido para la subfamilia Barnadesioideae (Kurtz da Costa, 2014). En esta tesis no se seguirá la clasificación de Corner 1976 y no se llamará testa al único tegumento (Schmid, 1986).

Aunque Bouman (1984) estableció una relación entre el tipo de nucelo, crasinucelado y tenuinucelado, y el número de capas iniciales intervinientes en el desarrollo del rudimento, dos capas germinales (bizonados) en óvulos con nucelo escaso o tres capas (trizonados) en óvulos con nucelo masivo, los únicos estudios de embriología en Barnadesioideae contradicen tal correlación ya que se observaron que en los rudimentos tenuinucelados tiene participación una tercera capa germinal, por lo tanto el modo de iniciación del rudimento seminal se relacionaría más a su tamaño que a un patrón preestablecido de desarrollo (Kurtz da Costa, 2014).

Está establecido que el clado de las Astéridas está caracterizado por óvulos tenuinucelados, asociados con el desarrollo de un endotelio, mientras que óvulos unitegumentados son exclusivos en las euastéridas, con algunas excepciones (Berberidopsidales, Caryophyllales, Santalales, Ericales) (Endress, 2011). De los estudios de la ontogenia y el desarrollo de óvulos de Asteraceae (Bonifacio *et al.*, 2018; Franca *et al.*, 2015; Frangiote-Pallone & de Souza, 2014; Galastri *et al.*, 2010) se ha comprobado además que en efecto la familia, posee óvulos unitegumentados donde el único tegumento se forma cuando éste comienza a curvarse y el tegumento inicia la cobertura del nucelo, al mismo tiempo que se diferencia la célula arqueosporica (Fig. 80).

La iniciación de los tegumentos es un hito fundamental en la morfogénesis de los óvulos y con ella las demás regiones, calaza, nucelo y funículo, son definidas (Endress, 2011). Los resultados de esta tesis coinciden con los estudios del desarrollo de *Dasyphyllum brasiliense* y *Schlechtendalia luzulifolia* y en asteráceas basales de las subfamilias Stiffitioideae y Wunderlichioideae que establecen que el óvulo posee un único tegumento asimétrico con un único lóbulo desarrollado del lado convexo (Kurtz da Costa, 2014; Bonifacio *et al.*, 2018).

De acuerdo con la bibliografía la formación de este tipo de tegumento, también denominado “semi anular”, depende de la relación entre la velocidad de curvatura del óvulo y la velocidad de crecimiento del tegumento desde el lado convexo hacia el cóncavo (Bowman, 1993). Según Bouman (1984) y Endress (2011) existen tres formas de formación del único

tegumento, la supresión de uno de los tegumentos, el desplazamiento tegumentario (*integumentary shifting*) y la fusión de los primordios tegumentarios; el tegumento masivo es para los autores una evidencia de que el único tegumento corresponde a la fusión de ambos.

De esta forma también, se puede clasificar al tegumento como “multiplicativo” ya que aumenta de tamaño, en términos de estratos celulares de espesor, durante el desarrollo del rudimento seminal (Schmid, 1986).

Según Endress (2011) la fusión tegumentaria también explicaría la curvatura anátropa de los óvulos porque, de acuerdo a estudios del comportamiento de mutantes del gen *inner no outer (ino)* en *Arabidopsis thaliana* (Elliott *et al.*, 1996; Schneitz *et al.*, 1997; Skinner & Gasser, 2009) no se observa curvatura cuando el tegumento externo está iniciado pero no desarrollado y el interno está bien desarrollado (Baker *et al.*, 1997; Schneitz *et al.*, 1997; Villanueva *et al.*, 1999; Gallagher & Gasser, 2008; Skinner & Gasser, 2009). Por lo tanto, el tegumento externo debe estar presente y ser inicialmente asimétrico para que se desarrolle la curvatura., mientras más corto es el tegumento externo menos curvado está el óvulo y si el tegumento no se forma no hay curvatura en absoluto (Sauquet *et al.*, 2003).

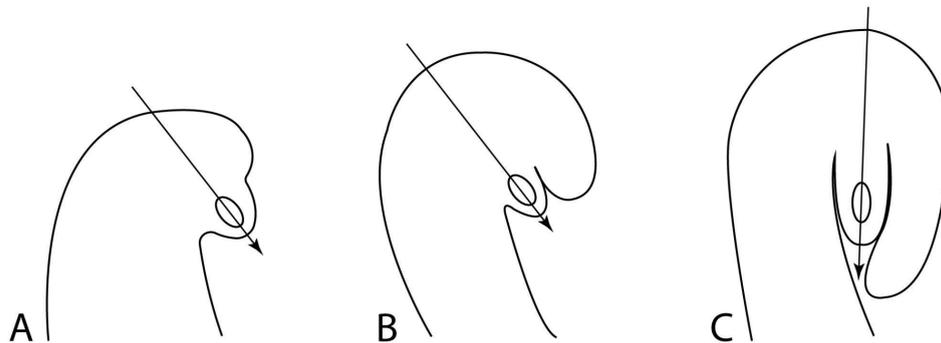


Figura 80. Esquema simplificado del desarrollo del óvulo unitegumentado en Asteraceae

Los óvulos, como los precursores en el desarrollo de las semillas, son órganos de central importancia para entender a éstas y aunque tienen su propia dinámica de desarrollo su simetría y curvatura dependen de su posición en el ovario, por lo que las semillas no pueden ser comprendidas sin comprender antes la disposición de las estructuras circundantes.

La supuesta secuencia evolutiva de la aparición de las partes del óvulo puede corresponderse con su secuencia de desarrollo ontogenética (Endress, 2011) (nucelo, tegumento interno, tegumento externo, funículo) y esta hipótesis está apoyada por estudios genéticos en *Arabidopsis* que comprueban que es más fácil afectar el desarrollo del

tegumento externo y el funículo que del nucelo y el tegumento interno (Schneitz *et al.*, 1998).

Tanto en óvulos como estambres, la zona donde sucede la meiosis se diferencia primero, y esto podría explicarse porque la diferenciación de arqueósporas requiere un tejido en contacto especializado y que necesita un tiempo considerable para acondicionarse.

Los resultados de esta tesis confirman a los óvulos como tenuinucelados incompletos, en congruencia con lo ya conocido para *Dasyphyllum brasiliense* y *Schlehtendalia luzulifolia* (Kurtz da Costa, 2014).

El tipo de nucelo es muy variable en angiospermas, manteniéndose constante a nivel de clados mayores, y siendo una variable de importancia a la hora de caracterizar a los óvulos. La estructura del nucelo es más fácil de analizar durante la profase I de la meiosis, cuando los tejidos nucelares todavía están intactos, ya que posteriormente con el crecimiento del megagametofito son aplastados y reabsorbidos.

La clasificación clásica de óvulos de acuerdo al grosor del nucelo incluye el crasinucelar, con varias capas hipodérmicas de células entre la arqueóspora y la epidermis nucelar y el tenuinucelar sin ninguna capa de células hipodérmicas pero, ha sido modificada para abarcar 6 tipos más específicos presentes en los grandes clados (Endress, 2011).

De acuerdo a la clasificación vigente los óvulos tenuinucelados incompletos pueden poseer células hipodérmicas en los flancos y por debajo de la arqueóspora como es el caso de los óvulos analizados.

En los óvulos tenuinucelados de Asterales, es común la presencia de un endotelio que se forma en el interior del tegumento (Kapil & Tiwari, 1978). La literatura describe al endotelio como de origen tegumentario, a partir de la epidermis interna del único tegumento (Tobe & Morin, 1996), sin embargo, en los taxones en que se observó se comprueba que este tejido tiene un doble origen: tegumentario-funicular. Este origen mixto es resultado de la ausencia del lóbulo ventral del tegumento (tegumento asimétrico) y del curvamiento que el rudimento seminal sufre y que pone en contacto directo a ambas estructuras, el ápice nucelar con la superficie funicular ventral.

En los ejemplares estudiados el endotelio se diferencia durante la meiosis I, y su mayor diferenciación ocurre en la megagametogénesis así como en otras Barnadesioideas (Kurtz da Costa, 2014) mientras que en otras Asteraceae como *Helianthus annuus* (Newcomb, 1973) y *Helycrisum rupestre* var. *messerii* (Villari, 1987) la diferenciación de este tejido sucede entre el establecimiento de la célula madre de la megaspóra y la meiosis I. Invariablemente del momento en que se diferencie, el endotelio está listo durante la organización del saco embrionario, aunque su tiempo de actividad es variable. El endotelio uniseriado y uninucleado es usual para Asteraceae aunque también se han descrito células multinucleadas (Pullaiah, 1984).

Como se expuso en los resultados las células del endotelio sufren polarización: las células se alargan en el sentido radial, los núcleos ocupando la porción externa y la región interna, en contacto con la megaspora o saco embrionario, desarrollando engrosamientos parietales muy pronunciados de composición pecto-celulósica y con vacuolas de sustancias pécticas. Esta polarización es más acentuada hacia el canal micropilar y puede estar relacionada al establecimiento de un complejo endotelio-células sinérgidas que se transforman en verdaderas células de transferencia (Kapil & Tiwari, 1978) cuyas paredes primarias sufren invaginaciones para aumentar el contacto con el saco embrionario. Las células de transferencia juegan un importante rol en el transporte de sustancias en distancias cortas y morfológicamente se reconocen dos tipos: reticuladas, que forman un complejo laberíntico variable, y en flange, que son proyecciones de las paredes en forma de costillas (Evert, 2006).

El obturador puede tener un origen tegumentario, funicular o nucelar (Batygina, 2002). En este contexto los obturadores observados en *Chuquiraga ruscifolia* y *Duseniella patagonica* fueron funiculares, coincidiendo con lo establecido para otras Barnadesioideae (Kurtz da Costa, 2014). El obturador funicular es usual para Angiospermas (Batygina, 2002), mientras que no es usual en Asteraceae (Sood & Thakur, 1985). El crecimiento del obturador a través de la micrópila (*Duseniella patagonica*) sugiere que podría ser (según Maheshwari, 1950) una estructura con función nutritiva para el tubo polínico.

Se verifica la presencia de hipóstasis, en todas las especies analizadas. La hipóstasis es una estructura que de acuerdo a estudios de desarrollo dentro de Campanulales está desarrollada en el clado MGCA (Tobe & Morin, 1996).

Los tipos de óvulos en Asteraceae, de acuerdo a los estudios disponibles en Mutiseae, son de tegumento "masivo" de 12 a 25 células de espesor, mientras que en Goodeniaceae de 18 a 20 células en lo que parece ser una tendencia para el clado MGCA, y con respecto al resto de Campanulales donde los óvulos son con tegumentos de tres a seis células de espesor. Otra característica notable de los óvulos analizados en Barnadesioideae es la tendencia del tegumento a proteger el saco embrionario (Fig. 81), es notable la porción micropilar que supera los dos tercios de la longitud total de los óvulos en *Barnadesia odorata*. Debido a que estas especies son tenuinuceladas, el crecimiento de la porción micropilar del tegumento puede ser una estrategia para proteger el gametófito femenino. También puede tener algún papel en la conducción y nutrición del tubo polínico debido al mayor desarrollo del canal micropilar.

Respecto a las características de la generación gametofítica, aunque los resultados no son concluyentes, en las especies analizadas puede afirmarse que se encuentra una única célula arqueosporial que funciona directamente como célula madre de la megaspora. Ésta sufre meiosis y da como resultado cuatro megasporas de las cuales las 3 micropilares

degeneran y sólo la calazal es la funcional. Finalmente se encuentra un saco embrionario de tipo *Polygonum* 7-celular, 8-nucleado, con tres células antipodales, dos sinérgidas y la oófera en el extremo micropilar y finalmente la célula central con dos núcleos.

Todas las especies analizadas mostraron características comunes del fruto y coincidieron con los caracteres generales otorgados para asteráceas: un fruto indehiscente uniseminado de inserción basal y no adnato al pericarpio. Tomaremos aquí el término cipsela, en referencia al fruto de Asteraceae, (Marzinek *et al.*, 2008) que surge de un ovario ínfero de origen hipantial (Erbar & Leins, 2010). Los frutos de Calyceraceae y Goodeniaceae, familias emparentadas a Asteraceae, también son aquenios (cipselas) indehiscentes, aunque Goodeniaceae también presenta frutos dehiscentes, por lo que este carácter parece ser plesiomórfico para Asteraceae (Lundberg, 2009).

Considerando el origen ínfero del ovario se adopta la definición *sensu lato* de pericarpio, propuesta por Roth (1977) en donde el exocarpo es producido por la epidermis externa del ovario ínfero, el endocarpo por la epidermis interna y el mesocarpo por la región parenquimática en que los tejidos vasculares están insertos, entre los haces vasculares y la única capa de endosperma se encuentra el remanente del tegumento del óvulo.

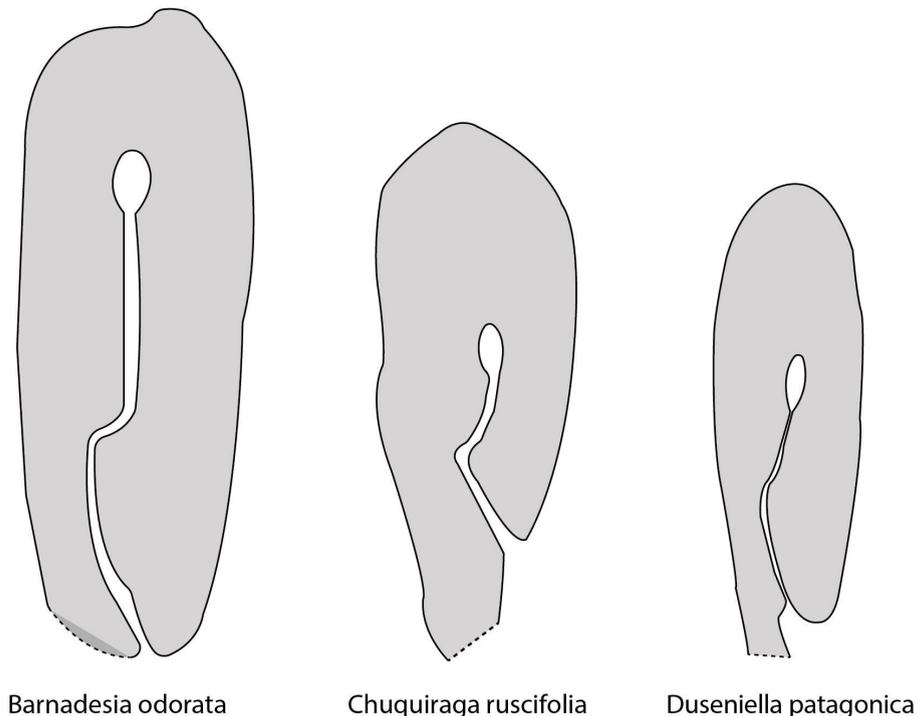


Figura 81. Esquema simplificado de los óvulos anátropos unitegumentados de Barnadesioideae. Escala 500 micrones.

En todas las especies analizadas pericarpio y tegumento están reducidos, al igual que *Schlechtendalia luzulifolia* (Mello *et al.*, 2009), que mostró la presencia de pericarpio y un

tegumento parenquimático no consumido, aunque puede tratarse de un fruto inmaduro. En el caso de *Dasyphyllum brasiliense* (Kurtz da Costa & Oliveira, 2011) el tegumento no está completamente consumido manteniéndose un remanente compactado.

Los meso y endocarpo consumidos son caracteres comunes en Asterales y podría ser una sinapomorfía para el orden (Johri *et al.*, 1992), aunque no sucede en Calyceraceae.

El pericarpo reducido con la compresión total de las capas de células con paredes delgadas, confieren liviandad al fruto favoreciendo su dispersión anemocórica (Galastri & Oliveira, 2010).

En todas las especies analizadas se observa un pericarpo que comprende la epidermis con tricomas y por debajo, en el remanente del tegumento se encuentran cristales en *Doniophyton weddellii* y *Duseniella patagonica*. Los cristales mayores los presentó *Duseniella patagonica* y fueron más abundantes hacia la parte basal de la cipsela. Las capas de células conteniendo cristales (oxalato de calcio, carbonatos o silica) son un tipo de refuerzo mecánico del fruto (Brewley *et al.*, 2013).

Como microcaracteres de uso taxonómico, en la bibliografía se encuentran estudios de ráfidos en cipselas de Senecioneae y Vernonieae y la presencia de fitomelanina que está restringida a la supertribu Heliantheae. Según la bibliografía las paredes de cipselas que poseen fitomelanina, no poseen ráfidos (cristales de oxalato) y viceversa (Robinson, 2009).

Es común que el pericarpo desarrolle espacios lisígenos en el mesocarpo (Mazirnek & Oliveira, 2010). El colapso del endocarpo hacia la maduración del fruto es un evento común en asteráceas ya descrito para otras tribus como Astereae, Vernonieae, Heliantheae, Cichorieae, Eupatorieae y Lactuceae (Kurtz da Costa & Oliveira, 2011).

En todas las especies, se encuentra una acumulación de sustancias pécticas o material de las células colapsadas, que podría ser lo que se describió como acumulación de compuestos fenólicos en *Dasyphyllum brasiliense* (Kurtz da Costa & Oliveira, 2011), o restos pécticos en *Schlechtendalia luzulifolia* (Mello *et al.*, 2009). La presencia de granos de almidón en el remanente del tegumento de *Duseniella patagonica* es una característica novedosa para la subfamilia.

Las características del embrión coinciden con la caracterización para la familia Asteraceae. Todas las especies analizadas mostraron poseer un embrión recto axial de tipo espatulado (según la clasificación de Martin, 1946) con un corto eje embrionario (hipocótilo y radícula), al igual que en otras subfamilias basales (Bonifacio *et al.*, 2018), los cotiledones ocupan desde un tercio hasta dos tercios de la longitud total y con endosperma escaso formando una capa de una célula de espesor alrededor del embrión (Jeffrey, 2009).

Los embriones siempre se mostraron ocupando toda la cámara seminal, libres del pericarpo y solo unidos por el funículo, con la plúmula no diferenciada en *Chuquiraga erinacea* y *Doniophyton weddellii*, lo cual no es siempre constante para los miembros de la familia

(Pandey & Singh, 1980) y parece depender más de la velocidad de establecimiento de la plántula (Galastri & Oliveira, 2010).

Los tipos de sustancias de reservas presentes en semillas pueden ser variados y se localizan en distintos tejidos. La literatura indica que la semilla de Asteraceae es rica en proteínas y lípidos (Mantese *et al.*, 2006) y que en la familia hay especies de semillas tanto exendospermadas como endospermadas (Schmid, 1986). Todas las especies analizadas se mostraron exendospermadas, y, excepto *Barnadesia polyacantha*, fueron positivas para la presencia de cuerpos proteicos y lipídicos localizados en los cotiledones del embrión. *B. polyacantha* y *Chuquiraga erinacea* mostraron además granos de almidón cristalinos. En el caso de *B. polyacantha*, aunque se visualizaron vesículas en las células, no pudo determinarse su composición.

En las especies estudiadas los cuerpos proteicos se encuentran en todo el embrión y son la reserva dominante, aunque según la bibliografía éstos pueden localizarse también en el endosperma o estar restringidos a una capa especializada (Boesewinkel & Bouman, 1984; Maldonado & Lott, 1991).

Los cuerpos proteicos, o “granos de aleurona” aunque ese término está siendo abandonado, son hidrolizados durante la germinación, constan de una matriz proteica que pueden contener cristales globoides electrodensos (grandes o pequeños, numerosos o escasos), proteínas cristaloides y drusas o cristales de oxalato de calcio. Los globoides del cuerpo proteico están compuestos de fitina (Mio-inositol 6-fosfato), que es fuente de reserva de fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro y manganeso (Lott, 1981).

En *Chuquiraga erinacea* se observaron cuerpos proteicos con uno o dos cristales globoides, en *Doniophyton weddellii* se observaron generalmente un cristal globoide y además proteínas cristaloides y en *Dusenilla patagonica* los cuerpos proteicos mostraron sólo un globoide. Se puede concluir que en las especies analizadas de barnadesioideae el número de globoides es bajo.

Análisis en *Helianthus annuus* y *Helicrysum bracteatum* revelaron que estas especies tienen cuerpos proteicos similares con numerosos cristales globoides pequeños y ausencia de proteínas cristaloides. Una estructura similar de los cuerpos proteicos se encontró en otros miembros de la familia como *Lactuca sativa*, *Bidens radiata* y *Bidens cernua* (Butrosse & Lott, 1978).

Los cuerpos lipídicos están formados por una matriz hidrofóbica de triglicéridos rodeada de una capa de fosfolípidos que le otorga estabilidad manteniéndolos como entidades separadas (Huang, 1992; Murphy, 2001; Mantese *et al.*, 2006). Se encontraron cuerpos lipídicos en tres de las cuatro especies analizadas, a excepción de *Barnadesia polyacantha*. Existen numerosos estudios en otros miembros de Asteraceae de importancia económica como el girasol, que demuestran que las reservas cotiledonares son ricas en proteínas y

lípidos y que van cambiando durante la ontogenia del embrión (Mantese *et al.*, 2006). Además de los cuerpos lipídicos y proteicos no queda casi espacio para otras fracciones citoplasmáticas en las células.

Como conclusión general, las Barnadesioideae no poseen el desarrollo y la estructura típica del capítulo de las restantes Asteraceae. La diversidad en el proceso de fraccionamiento del meristema de la inflorescencia y la zonación meristemática se pueden interpretar como etapas intermedias o como variantes evolutivas entre la inflorescencia de las Calyceraceae y el capítulo típico de las Asteraceae. La presencia de una flor central terminal en algunas especies de barnadesioideas es sin duda un elemento remanente de los cefalodios de las Calyceraceae. De modo que, en cuanto al desarrollo y la estructura de la inflorescencia, las Barnadesioideae aún conservan evidencias que conectan el capítulo de las Asteraceae con las inflorescencias de su grupo hermano. En cuanto al desarrollo floral, la secuencia de iniciación de ciclos florales que comienza con la corola y ubica al cáliz en diferentes momentos posteriores, ya está presente en algunas Calyceraceae y en barnadesioideas, y puede considerarse una alteración del desarrollo relacionada a la profunda modificación del cáliz en las Asteraceae (cfr. Naghiloo & Claßen-Bockhoff, 2017). En cuanto a la sexualidad de las flores, las flores pistiladas de Barnadesioideae pueden haber surgido por dos mecanismos diferentes: uno que detiene el normal desarrollo de la microsporogénesis y otro que inhibe el desarrollo de los primordios estaminales. En las Calyceraceae, en cambio, no hay especies con flores pistiladas, sólo *Acicarpha* combina flores perfectas con estaminadas por interrupción del proceso de megasporogénesis. Es así como el grupo hermano de las Asteraceae tiene especies con todas sus flores perfectas, y especies andromonoicas. La ginomonoecia y la presencia de flores estériles, propia de las asteráceas, ya está presente en las barnadesioideas. En cuanto a los caracteres embriológicos, aún falta mucha información por parte de las Calyceraceae para realizar un análisis profundo. Sin embargo, es posible reconocer que las Barnadesioideae poseen un desarrollo normal de las anteras y del polen, que se asemeja al de la mayoría de las dicotiledóneas. La megasporogénesis y megagametogénesis observada en barnadesioideas, que conduciría a un tipo de desarrollo *Polygonum*, es la más frecuente en angiospermas. Esta información sugiere que, como grupo basal de las Asteraceae, las Barnadesioideae poseen procesos embriológicos regulares y comunes a la mayoría de las angiospermas, y que éstos han sido el punto de partida para la diversificación embriológica que se conoce en las restantes asteráceas.

6. CONCLUSIONES

6.1 Desarrollo de inflorescencias y flores

Meristema de la Inflorescencia

- Se observaron meristemas de la inflorescencia tanto planos como convexos no encontrándose correlación entre esta característica con el tipo de capítulo, la sexualidad del mismo o el género de los taxones analizados.
- La forma del receptáculo de la inflorescencia está directamente relacionada con la forma inicial del meristema que le dio origen, no habiéndose registrado en ningún caso un cambio de morfología entre estas dos estructuras durante el curso de la ontogenia y que los cambios sufridos en este proceso son producto de la expansión del meristema/receptáculo pero no de un cambio de forma.
- La zonación meristemática observada en *Barnadesia odorata* puede ser explicada por la hipótesis de que el capítulo es en realidad un estructura determinada que deriva de más de un meristema.
- La disposición caótica de primordios florales observada en las Barnadesioideae analizadas, puede explicarse mediante el modelo de “Desplazamiento lateral de primordios” de Zhang y colaboradores (2021), como resultado de la falta de espacio y la progresión de un “Frente de iniciación de primordios” que pierde la simetría a medida que avanza.
- La orientación variable de las flores, registrada para *Arnaldoa macbrideana* (Erbar & Leins, 2000) es corroborada en *Barnadesia aculeata* y *B. odorata* y podría responder a diferentes causas como: la pérdida de la filotaxis, la presencia de áreas de receptáculo libre, el desarrollo tardío del verticilo cáliz, los cambios en la simetría de las flores del radio o la condensación de flores de diferentes órdenes de ramificación.

Flor terminal

- Se corrobora la presencia de flor terminal para las especies con capítulos radiados como *Huarpea andina* y *Barnadesia aculeata* y se registra por primera vez su ocurrencia en capítulos discoideos de dos especies del género *Chuquiraga*, *C. avellanadae* y *C. erinacea*.
- La presencia de flor terminal, la zonación meristemática, el patrón filotáctico alterado, con su disposición caótica de primordios y zonas de receptáculo libre, y la orientación variable de las flores en el capítulo contribuyen a la idea original de Erbar

& Leins (2000) que sugieren que el ancestro de las asteráceas podría haber tenido una inflorescencia compleja

- Se concluye que la presencia de flor terminal y la zonación meristemática pueden ser evidencias, junto con nuevos estudios del control genético del capítulo en *Gerbera hybrida* y estudios del desarrollo de la inflorescencia en la familia Calyceraceae, de que el capítulo de Asteraceae podría haber evolucionado desde un simple cefaloide mediante la pérdida de flor terminal y la supresión de los grupos cimosos o la transformación de sus meristemas.

Desarrollo de flores

- La secuencia de aparición de los verticilos en el primordio floral no tiene relación con el tipo de capítulo.
- El orden de iniciación de los verticilos en las flores corola, androceo y gineceo concuerda con lo conocido para Asteraceae (CAG), mientras que el cáliz es variable respecto a su aparición.
- El desarrollo del verticilo corola es heterocrónico con respecto a Angiospermas para la subfamilia basal Barnadesioideae, al igual que el resto de Asteraceae.
- La condición gamopétala de la corola se inicia tempranamente, con los lóbulos corolinos desarrollándose a partir de un anillo meristemático previo expresado a partir del estado de embudo o “*funnel*”.

Flores del radio

- La identidad de las flores del radio se establece muy tempranamente y está definida por el menor tamaño de los primordios florales, resultado de un fraccionamiento diferencial y no equitativo del meristema de la inflorescencia, y/o por el atraso de su desarrollo durante la organogénesis.
- El criterio de Harris para identificar flores del radio, basado en la forma de sus primordios aplica para *Dusenilla patagonica*, pero no para *Barnadesia odorata*, donde todos los primordios tienen misma forma pero distinto tamaño, y tampoco para *Schlechtendalia luzulifolia* que tiene variedad de formas y tamaños siendo el capítulo isomorfo y homógamo. Puede concluirse que en el caso de *S. luzulifolia* la forma de los primordios no depende del tipo de flor resultante sino de la posición que ocupa en el capítulo.
- En los capítulos disciformes con flores del radio femeninas, los mecanismos que subyacen al desarrollo de la unisexualidad son diferentes, en el caso de *Doniophyton weddelli*, se asocia a la muerte celular programada adelantada del

tapete y, en *Duseniella patagonica*, a genes controladores de la identidad de los verticilos florales.

Sistemas reproductivos: la especialización de las flores del radio y la flor terminal

- La ginomonoecia observada en los géneros *Duseniella* y *Doniophyton* es un sistema reproductivo bien establecido y constituye una de las divisiones del trabajo de la inflorescencia y como en otras asteráceas comprueba que el pseudanto otorga mayor plasticidad evolutiva respecto a las flores solitarias.
- La esterilidad de la flor terminal de *Huarpea andina* y la retención de los verticilos androceo y gineceo aunque estériles, es otro ejemplo de división del trabajo en el pseudanto y jugaría un rol importante en la atracción de polinizadores y por lo tanto en la optimización de la producción de semillas.

Papus

- Sobre la base de los estudios genéticos más recientes el papus es homólogo al cáliz y tiene un origen sepaloide evidenciado por la iniciación secuencial del mismo en cinco puntos alternipétalos.
- La iniciación al azar del papus (Harris, 1995) es indistinguible de la iniciación secuencial cuando no hay un espaciamiento óptimo entre primordios

Indumentos

- El desarrollo de los indumentos en el receptáculo, la corola y el ovario, se desenvuelve independiente del desarrollo de los verticilos florales no estando sujeto a los mismos tiempos de desarrollo y siendo independientes en flores del disco y radio.

6.2 Esporangiógenesis, microsporogénesis y microgametogénesis

- Las arqueósporas muestran expresión de diferenciación celular premeiótica (DCP) y la extensión del gradiente de DCP a células del tapete durante la esporangiogénesis lo que se relaciona a mecanismos de selección de células madre de las microsporas e interpreta que el destino celular depende de la interacción genoma-ambiente y la regulación celular recíproca
- En cuanto a la microgametogénesis se corrobora para Asteraceae multiplicación de arqueósporas, organización del tejido arqueosporial y tipo de tétradas microsporas.

Esporodermis

- La cronología de desarrollo de las capas de la esporodermis es primexina, endexina, ectenixa, intina.
- Tanto primexina como endexina tienen una procedencia gametofítica ya que están desarrolladas antes de que las microsporas se liberen de su envoltura de calosa en los momentos posteriores a la meiosis.
- De acuerdo con las pruebas histoquímicas realizadas la primexina tiene una naturaleza protoesporopolenínica polisacáridica y proteica mientras que la endexina muestra composición variada encontrándose además del componente principal, esporopolenina, polisacáridos y proteínas en distinto grado.
- La endexina tiene continuidad estructural en todo el grano de polen y su espesor es mayor hacia las aberturas.
- En *Barnadesia odorata* y *Huarpea andina* se comprueba que la ectexina se impregna en forma centrípeta de los componentes esporopolenínicos lo que la hace paulatinamente más inerte a las pruebas histoquímicas.
- El número de capas de la ectexina y presencia o ausencia de cáveas del grano de polen es congruente con lo publicado para la subfamilia Barnadesioideae.

Tapete

- El tapete muestra un origen doble en la zona interna que está en contacto con el tejido conectivo, por la presencia de una o dos células ubicadas en una fila adicional o ubicadas en cuña que interrumpen el ordenamiento concéntrico de esta capa.
- *Barnadesia odorata* y *Duseniella patagonica* muestran el síndrome de polarización del tapete secretor donde se observan evaginaciones citoplasmáticas en las paredes tangenciales internas de las células que multiplican el área superficial de membrana plasmática y pared para secretar sustancias en grandes cantidades.
- Aunque filogenéticamente el tapete secretor es considerado plesiomórfico en Asteraceae, en la subfamilia basal de las compuestas, Barnadesioideae se observaron ambos tipos de tapete y en *Schlechtendalia luzulifolia* la ocurrencia de ambos tapetes simultáneos.

Sustancias de reserva

- Se encontró variación respecto al momento del ciclo de amilogénesis-amilólisis en que se encontraron las especies durante la dehiscencia de las anteras por lo que se concluye que el mayor o menor contenido de granos de almidón no tiene un significado sistemático sino ecológico respecto del agente polinizador.

- En *Chuquiraga jussieui*, *C. aurea* y *C. parviflora*, se corrobora la relación entre el tipo de polen, *starchy* o *starchless*, y el tipo de síndrome de polinización: *starchy*-ornitófilo y *starchless*-entomófilo.
- Para los granos de polen *starchless* de *Barnadesia odorata* y *Huarpea andina* no se corroboran las correlaciones entre tipo de grano y síndrome de polinización (Baker & Baker, 1979) con los estudios de biología floral al respecto (Galetto 1995).

Endotecio y tejidos involucrados en la dehiscencia

- Se corrobora para Barnadesioideae las observaciones del trabajo más reciente sobre caracteres estaminales en la subfamilia (Svoma et al, 2019), donde se observó que todos los géneros de Barnadesioideae poseen células endoteciales con engrosamientos radiales y menos comúnmente engrosamientos longitudinales y oblicuos (*Dasyphyllum* y *Archidasyphyllum*), y con otros trabajos anteriores que establecen engrosamientos en barras radiales (“ridge like” para *Arnaldoa macbrideana* (Erbar & Leins 2000)) y longitudinales (*Barnadesia*, *Huarpea* (Bremer 1994))
- Se describe por primera vez para Barnadesioideae un sistema complejo de interacción de tejidos durante la dehiscencia de las anteras en que participan además del endotecio, el tejido conectivo, la epidermis y la hipodermis conectiva.
- Se describe la participación diferencial de los tejidos en este mecanismo donde el endotecio de los lóculos externos presenta engrosamientos y una mecánica diferente a la de los lóculos internos.

6.3 Desarrollo de ovarios, óvulos y semillas

Ovarios y óvulos

- Se corrobora la presencia de ovarios con un único óvulo, esperable para el grupo Calyceraceae + Asteraceae y la presencia de hipóstasis calazal, carácter presente en todo el clado MGCA.
- Las características de los óvulos analizados de Barnadesioideae concuerdan con lo esperable para el clado de las euastéridas (*Core eudicots: Asterid alliance*), óvulos anátropos unitegmentados, con tegumento masivo de 12 a 25 células de espesor, tenuinucelados, con desarrollo de endotelio, caracteres que están conservados a nivel de la macrosistemática.
- El nucelo tenuinucelado incompleto, el único tegumento asimétrico desde su origen el endotelio de origen doble: tegumentario-funicular y el obturador funicular coinciden

con lo ya conocido para el resto de Barnadesioideae, *Dasyphyllum brasiliense* y *Schlechtendalia luzulifolia* (Kurtz da Costa, 2014).

Semillas

- Se corrobora que el fruto de Barnadesioideae es una cipsela, que por definición surge de un ovario ínfero de origen hipantial.
- Todas las especies analizadas mostraron caracteres comunes del fruto otorgados para asteráceas: un fruto seco, indehiscente, uniseminado, semilla de inserción basal, no adherida al pericarpio, caracteres considerado plesiomórficos para Asteraceae
- Se corrobora la reducción del pericarpio, carácter común en Asteraceae, y el colapso del endocarpo hacia la maduración del fruto común en asteráceas en otras tribus de la familia como Astereae, Vernonieae, Heliantaeae, Cichorieae, Eupatorieae y Lactuceae.
- Se corroboran las características del embrión esperables para la familia Asteraceae, embrión recto axial de tipo espatulado con un corto eje embrionario.
- La semilla es exendospermada (a lo sumo con un único estrato remanente de endosperma) y se corrobora la presencia de proteínas como sustancia de reserva principal y lípidos como reserva secundaria, lo que es esperable para la familia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlers, F; Lambertb, J; Wiermanna, R. 2003. Acetylation and silylation of piperidine solubilized sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. Z. Naturforsch. C 58: 807-811.
- Ahlstrand, L. 1985. Embryology of Calenduleae (Compositae). Nord. J. Bot. Vol (5): 79-97.
- Ariizumi, T. & Toriyama, K. 2011. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. Annu. Rev. Plant Biol. 62, 437–460.
- Ao, C; Wang, L; Liang, L; Wang, X. 2009. Anther wall formation, microsporogenesis and male gametogenesis of four closely related species in Astereae (Asteraceae): description, comparison and systematic implications. Nordic J. Bot. 27. 292-297.
- Aouali, N; Laporte, P; Clément, C. 2001. Pectin secretion and distribution in the anther during pollen development. Planta 213: 71–79.
- Aya, K; Ueguchi-Tanaka, M; Kondo, M; Hamada, K; Yano, K; Nishimura, M; Matsuoka, M; 2009. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. Plant Cell 21, 1453e1472.
- Baker, H. G. & Baker, I. 1979. Starch in Angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. Am. J. Bot. 66: 591–600
- Baker, H. G. & Baker, I. 1982. Starchy and starchless pollen in the Onagraceae. Ann. Missouri Bot. Gard. 68:748-754.
- Baker, H. G & Baker, I. 1983. Some evolutionary and taxonomic implications of variation in the chemical reserves of pollen. In: Mulcahy, D. L; & Ottaviano, E. (eds): Pollen: Biology and implications in plant breeding. Elsevier Biomedical, New York, pp. 42-51.
- Baker, S. C; Robinson-Beers, K; Villanueva, J. M; Gaiser, J. C; Gasser, C. S. 1997. Interactions among genes regulating ovule development in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 145: 1109–1124.
- Barker, M, S; Li, Z; Kidder, T. I; Reardon, C. R; Lai, Z; Oliveira, L. O; Scascitelli, M; Riesenber, L. H. 2016. Most Compositae (Asteraceae) are descendants of a paleohexaploid and all share a paleotetraploid ancestor with the Calyceraceae. Am. J. Bot. 103 (7): 1203-1211.
- Batygina, T. B. 2002. Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. Vol (1). Generative organs of flower. Enfield, USA. Science Publishers Inc, 2002.
- Battjes, J; K. Bachmann & F. Bouman. 1992. Early development in *Microseris pygmaea* D. Don strains C96 and A92 (Asteraceae: Lactuceae). Bot. Jahrb. Syst. 113: 461-475.

- Battjes, L; Chambers, K. L; Bachmann, K. 1994. Evolution of Microsporangium Numbers in *Microseris* (Asteraceae: Lactuceae). *Am. J. Bot.* 81 (5): 641-647.
- Bentham, G. 1873. Compositae. Pp. 163–533 in: Bentham, G. & Hooker, J.D. (eds.), *Genera Plantarum*, vol. 2(1). Reeve, London.
- Bhandari, N. N. 1971. Embryology of the Magnoliales and comments on their relationships. *J. Arnold Arbor. Harv. Univ.* 52: 1-39, 285-304.
- Blackmore, S. Wortley, A. H; Skvarla, J. J; Rowley, J. R. 2007. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist.* 174: 483-498.
- Blackmore, S; Wortley, A. H; Skvarla, J. J; Gabarayeva, N. I; Rowley, J. R. 2010. Developmental origins of structural diversity in pollen walls of Compositae. *Plant Syst. Evol.* 284: 17-32.
- Boesewinkel, F. D. & Bouman, F. 1984. The Seed: Structure. In *Embryology of Angiosperms*; Mohri, B.M; Ed.; Springer:Berlin/Heidelberg, Germany.
- Bonifacio, S. K. V; Moura, L. L; Mazirnek, J; Cavalari De-Paula, O. 2018. Comparative embryology of *Stiffia* and *Wunderlichia* and implications for its evolution in Asteraceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 189 (2) :1-17.
- Bonner, L. J. & Dickinson, H. G. 1990. Anther dehiscence in *Lycopersicon esculentum* L. Water relations. *New Phytol.* 115: 367–375.
- Bouman, F. 1984. The Ovule. Pp. 123-157. In *Embryology of Angiosperms* (B. M. Johri, ed). Springer-Verlag, Berlin.
- Bowman, J. L. 1993. *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. New York: Springer.
- Bremer, K. & Jansen, R. K. 1992. A new subfamily of Asteraceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 414–415.
- Bremer, K; Backlund, A; Sennblad, B; Swenson, U; Andreassen, K; Hjertson, M; Lundberg, J; Backlund, M; Bremer, B. 2001. A phylogenetic analysis of 100+ genera and 50+ families of euasterids based on morphological and molecular data with notes on possible higher level morphological synapomorphies. *Plant Syst. Evol.* 229: 137-169.
- Brewley, J. D; Bradford, K. J; Hilhorst, H. W. M; Nonogaki, H. 2013. *Seeds, Physiology of development, germination and dormancy*, 3rd edition. Springer.
- Broholm, S. K; Tahtiharju, S; Laitinen, R. A. E; Albert, V. A; Teeri, T. H; Elooma, P. 2008. A TCP Domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. *PNAS* 105(26): 9117-9122.
- Buttrose, M. S. & Lott, J. N. A. 1978. Inclusions in seed protein bodies in members of the Compositae and Anacardiaceae: comparison with other dicotyledonous families. *Can. J. Bot.* 56: 2062-2071.

- Cabrera, A. L. 1951. Huarpea, un nuevo género de Compuestas, Bol. Soc. Argent. Bot. 4: 129-132.
- Cabrera, A. L. 1959. Revisión del género *Dasyphyllum*. Rev. Mus. La Plata, Tomo IX. Bot. 38. FCNyM. UNLP.
- Cabrera, A. L. 1997. Nota crítica en la tribu Mutisieae (Compositae) para la flora de Paraguay. Candollea 52, 216.
- Calvino, E. 1952. Le sostanze di riserva dei pollinie illoro significato filogenetico, ecologico, embriologico. Giom. Bot. Ital. 59: 1-26.
- Carrizo García, C. 2002. An approach to the diversity of endothelial thickenings in Solanaceae. Flora 197: 214-223.
- Carrizo García, C; Matesevach, M; Barboza, G. 2008. Features related to anther opening in *Solanum* species (Solanaceae). Bot. J. Linn. Soc. 158: 344–354.
- Cetinbas, A. & Ünal, M. 2012. Comparative ontogeny of hermaphrodite and pistillate florets in *Helianthus annuus* L. (Asteraceae). Not. Sci. Biol. 4, 30–40.
- Chen, J; Chu-Ze Shen, Yan-Ping Guo, & Guang-Yuan Rao. 2018. *Patterning the Asteraceae Capitulum: Duplications and Differential Expression of the Flower Symmetry CYC2-Like Genes*. Front. Plant. Sci. Vol 9: 551.DOI:10.3389/fpls.2018.00551
- Chase, M. W; D.E. Soltis, R. G. Olmstead, D. Morgan, D. H. Les, B. D. Mishler, M.R. Duvall, R. A. Price, H.G. Hills, Y.-L. Qiu, K.A. Kron, J.H. Rettig, E. Conti, J.D. Palmer, J. R. Manhart, K.J. Sytsma, H.J. Michaels, W.J. Kress, K. G. Karol, W. D. Clark, M. Hedrén, B.S. Gaut, R.K. Jensen, K.-J. Kim, C.F. Wimpee, J.F. Smith, G.R. Furnier, S.H. Strauss, Q.-Yun Xiang, G.M. Plunkett, P. S. Soltis, S. M. Swensen, S. E. Williams, P. A. Gadek, C. J. Quinn, L.E. Eguiarte, E. Golenberg, G.H. Learn, Jr; S. 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid rbcL. Ann. Missouri Bot. Gard. Vol 80 (3): 528-580.
- Claßen-Bockhoff, R; Bull-Hereñu, K. 2013. Towards an ontogenetic understanding of inflorescence diversity. Ann. Bot. 112: 1523–1542.
- Clement, C. & Audran, J. C. 1993. Orbicule wall surface characteristics in *Lilium* (Liliaceae). An ultrastructural and cytochemical approach. Grana 33: 338-353
- Clement, C. & Audran, J. C. 1995. Anther wall layers control pollen sugar nutrition in *Lilium*. Protoplasma 187: 172–181.
- Contrin Ventrella, M; Lanna Almeida, A; Araújo Nery, L; Pecanha de Miranda Coelho, V. 2013. Métodos Histoquímicos aplicados ás sementes. Universidade Federal de Viçosa.
- Cosner, M. E; Jansen, R. K; Lammers, T. G. 1994. Phylogenetic relationships in the Campanulales based on rbcL sequences. Plant Syst. Evol. 190:79–95.
- Cronquist, A. 1955. Phylogeny and taxonomy of the Compositae. American Midland Naturalist 52: 478–511.

- D'Ambroggio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas en Histología Vegetal. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Davis, G. L. 1962. Embryological studies in the compositae, I. Sporogenesis, Gametogenesis, and Embryogeny in *Cotula australis* (Less.) Hook. F. Aust. J. Bot. 10(1) 1-12.
- Davis, G. L. 1964. Embryological studies in the Compositae. IV. Sporogenesis, gametogenesis, and embryogeny in *Brachycome ciliaris* (Labill.) Less. Aust. J. Bot. 12: 142–151
- Davis, G. L. 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. John Wiley & Sons, New York.
- Dadpour, M. R; Naghiloo, S; Faridi Neycharan, S. 2012. The development of pistillate and perfect florets in *Xeranthemum squarrosum* (Asteraceae). Plant BioL. 14 (1): 234–243. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00469.x>
- Delpino, F. (1890). Note ed osservazioni botaniche. Decuria secunda. Malpighia 4: 28–30.
- Deng Y; Chen, S; Teng, N; Chen, F; Li, F; Song, A; Guan, Z. 2010. Flower morphologic anatomy and embryological characteristics in *Chrysanthemum multicaule* (Asteraceae). Scientia Hort. 124. 500-505.
- Dettker, G. A. & Pires dos Santos, R. 2011. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. R. bras. Bioci; Porto Alegre. Vol 9 s 1: 48-74.
- DeVore, M. 1994 . Systematic studies of Calyceraceae. Ph.D. dissertation, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA
- Dickinson, H. G. & Potter, U. 1976. The Development of patterning in the alveolar sexine of *Cosmos bipinnatus*. New Phytol. 76, 543-550.
- Dormer, K. J. 1962. The fibrous layer in the anthers of Compositae. New Phytol. 61, 2.
- Elliott, R. C; Betzner, A. S; Huttner, E, et al. 1996. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. The Plant Cell 8: 155–168.
- Elooma, P; Zhao, Y; Zhang, T. 2018. Flower heads in Asteraceae: Recruitment of conserved developmental regulators to control the flower-like inflorescence architecture. Horticulture Research 5:6.
- Endress, P. K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge.
- Endress, P. K. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. Ann. Bot. 107: 1465-1489.
- Erbar, C. 1991. Sympetaly, a systematic character?. Bot. Jahrb. Syst. 112(4): 417-451.
- Erbar, C. & Leins, P. 2000. Some interesting features in the capitulum and flower of *Arnaldoa macbrideana* Ferreyra (Asteraceae, Barnadesioideae). Bot. Jahrb. Syst. 122: 517-537.

- Erbar, C. & Leins, P. 2015. Diversity of styles and mechanisms of secondary pollen presentation in basal Asteraceae. New insights in phylogeny and function. *FLORA* 217: 109-130.
- Evans, D. E; Taylor, P. E; Singh, M. B; Knox, R. B. 1992. The interrelationship between the accumulation of lipids, protein and the level of acyl carrier protein during the development of *Brassica napus* L. pollen. *Planta* 186:343–354
- Evans, D. E; Taylor P. E; Singh, M. B; Knox, R. B. 1991. Quantitative analysis of lipids and protein from the pollen of *Brassica napus* L. *Plant Sci.* 73:117–126.
- Ezcurra, C. 1985. Revisión del Genero *Chuquiraga*. (Compositae-Mutiseae). *Darwiniana*. 26 (1-4): 219-284.
- Ezcurra, C. 2002. Phylogeny, Morphology, and Biogeography of *Chuquiraga*, an Andean-Patagonian Genus of Asteraceae-Barnadesioideae. *Bot. Rev.* 68 (1): 153-170.
- Faegri, K. & Iversen, J. 1964. Textbook of pollen analysis. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 237 p
- Ferrer, M. M. & Good-Avila, S. V. 2007. Macrophylogenetic analyses of the gain and loss of self-incompatibility in the Asteraceae. *New Phytol.* 173: 401–414.
- Ferreira, PdL; Saavedra, M. M; Groppo, M. 2019. Phylogeny and circumscription of *Dasyphyllum* (Asteraceae:Barnadesioideae) based on molecular data with the recognition of a new genus, *Archidasyphyllum*. *PeerJ* 7 (2).
- Fitzgerald, M. A. & Knox, R. B. 1995. Initiation of primexine in freeze substituted microspores of *Brassica campestris*. *Sex Plant Reprod.* 8: 99–104.
- Floyd, S. K; Lerner, V. T; Friedman, W. E. 1999. A developmental and evolutionary analysis of Embryology in *Platanus* (Platanaceae), a basal Eudicot. *Am. J. Bot.* 86 (11): 1523–1537.
- Franca, R. de Oliveira; Cavalari De-Paula, O; Carmo-Oliveira, R; Marzinek, J. 2015. Embryology of *Ageratum conyzoides* L. and *A. fastigiatum* R.M. King & H. Rob. (Asteraceae). *Acta Bot. Brasil.* 29 (1): 8-15. DOI: 10.1590/0102-33062014 abb3609
- Franchi, G. G; Bellani, L; Nepi, M; Pacini, E. 1996. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *FLORA* 191: 143-159.
- Frangiote-Pallone, S. & de Souza, L. A. 2014. Pappus and cypsela ontogeny in Asteraceae: structural considerations of the tribal category. *Rev. Mex. Biodivers.* 85: 62-77. DOI: 10.7550/rmb.32809
- Friedman, W. E. 2006. Embryological evidence for developmental lability during early angiosperm evolution. *Nature* 44 (7091): 337-340.
- Friedman, W. E. & Ryerson, K. C. 2009. Reconstructing the ancestral female gametophyte of

- angiosperms: insights from *Amborella* and other ancient lineages of flowering plants. *Am. J. Bot.* 96 (1): 129–143.
- Funk, V. A; Susanna, A; Stuessy, T. F; Robinson, H. 2009. Classification of Compositae pp 171-189. In: Funk V, Susanna A, Stuessy TF, Bayer R, eds. Systematics, evolution and biogeography of Compositae. Vienna: IAPT.
- Funk, V. A; Roque, N. 2011. The monotypic Andean genus *Fulcaldea* (Compositae, Barnadesioideae) gains a new species from northeastern Brazil. *TAXON* 60 (4): 1095-1103.
- Furness, C. A; Rudall, P. J; Sampson, F. B. 2002. Evolution of Microsporogenesis in Angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 162(2): 235-260.
- Galastri, N. A. & Oliveira, D. M. T. 2010. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Vernonia platensis* (Spreng.) Less. (Asteraceae). *Acta Bot. Brasil.* 24:73-83.
- Galetto, L. 1995. Estudios sobre el néctar y los nectarios en *Hyaloseris rubicunda* y *Barnadesia odorata* (Asteraceae-Mutisieae). *Darwiniana* 33: 127-133.
- Gallagher, T. L; Gasser, C. S. 2008. Independence and interaction of regions of the INNER NO OUTER protein in growth control during ovule development. *Plant Physiol.* 147: 306–315
- Gamerro, J. C. 1985. Morfología del polen de *Huarpea*. *Darwiniana* 26 (1–4), 43–51.
- Gerrits, P. O. & Smid, L. 1983. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J. Microsc.* 132:81-85.
- Goldberg, R. B; Beals, T. P; Sanders, P. M. 1993. Anther Development: Basic principles and practical applications. *The Plant Cell.* Vol (5): 1217- 1229.
- Gotelli, M. M; Galati, B; Medan, D. 2008. Embryology of *Helianthus annuus* (Asteraceae). *Ann. Bot. Fennici* 45: 81-96.
- Granda, P. A. 1997. Una nueva especie de *Chuquiraga* (Asteraceae–Mutisieae) del Perú. *Kurtziana* 25, 151–156.
- Gruenstaedl, M; Urtubey, E; Jansen, R. K; Samuel, R; Barfuss, M. H. J; Stuessy, T. F. 2009. Phylogeny of Barnadesioideae (Asteraceae) inferred from DNA sequence data and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51: 572-587.
- Guarnieri, M; Speranza, A; Nepi, M; Artese, D; Pacini, E. 2006. Ripe pollen carbohydrate changes in *Trachycarpus fortunei*: the effect of relative humidity. *Sex Plant Reprod.* DOI 10.1007/s00497-006-0027-3.
- Gubatz, S; Arendt, S; Rittscher, M; Wiermann, R. 1992. Recent aspects of sporopollenin biosynthesis. In: *Angiosperm Pollen and Ovules*. Springer New York, New York, NY, pp. 187–190.
- Gustafsson, M. H. G. & Bremer, K. 1995. Morphology and phylogenetic interrelationships of

- the Asteraceae, Calyceraceae, Campanulaceae, Goodeniaceae, and related families (Asterales). *Am. J. Bot.* 82: 250-265.
- Gustafsson, M. H. G; Pepper, A. S. R; Albert, V. A; Källersjö, M. 2001. Molecular phylogeny of the Barnadesioideae (Asteraceae). *Nordic J. Bot.* 21, 149–160.
- Hansen, H. V. 1997. Studies in the Goodeniaceae and the Brunoniaceae with a discussion of their relationship to Asteraceae and Calyceraceae. *Nordic J. Bot.* 17: 495-510.
- Harling, G. 1991. Compositae—Mutisieae. In: Harling, G; Andersson, L. (Eds.), *Flora of Ecuador*, no. 42. Department of Systematic Botany, University of Göteborg, Göteborg, pp. 1–105.
- Harris, E. M. 1994. Developmental evidence for the derivation of Syncephalia in *Lagascea* (Heliantheae; Asteraceae). *Am. J. Bot.* 81(9): 1139-1148.
- Harris, E. M. 1995. Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: A synthesis of historical and current concepts. *Bot. Rev.* 61: 93-280.
- Harris, E. M; Tucker, S. C; Urbatsch, L. E. 1991. Floral Initiation and early development in *Erigeron philadelphicus* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* 78(1): 108-121.
- Heslop-Harrison, J. 1968. The Pollen Grain Wall. *Science.* 161: 230-237.
- Heslop-Harrison, Y. 1977. The pollen–stigma interaction: pollentube penetration in *Crocus*. *Annals of Botany*, 41: 913–922.
- Heslop-Harrison, J; Heslop-Harrison, Y; Knox, R. B; Howlett, B. 1973. Pollen wall proteins: “Gametophytic” and “Sporophytic” fractions in pollen walls of Malvaceae. *Ann Bot* 37: 402-412.
- Hesse, M. 2000. Pollen wall stratification and pollination. *Plant Syst. Evol.* 222: 1-17.
- Hind, D. J. N. 2001. A new species of *Barnadesia* (Compositae: Barnadesieae) from Bolivia. *Kew Bulletin* 56: 705–709.
- Hoekstra, F. A; Crowe, L. M; Crowe, J. H. 1989. Differential desiccation sensitivity of corn and Pennisetum pollen linked to sucrose content. *Plant Cell Environ.* 12: 83–91.
- Hofmeister, W. 1868. *Allgemeine morphologie der Gewächse*. Engelmann, Leipzig. 664 pp.
- Horner, H. T. & Pearson, C. B. 1978. Pollen wall and aperture development in *Helianthus annuus* (Compositae: Heliantheae). *Am. J. Bot.* 65 (3): 239-309.
- Hsieh, K. & Huang, A. 2004. Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol.* 136: 3427–3434.
- Huang, A. H. 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 177–200.
- Huang, A. H. C. 1996. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* 110:1055–1061.
- Hufford, L. D. & Endress, P. 1989. The diversity of anther structures and dehiscence patterns among Hammamelididae. *Bot. J. Linn. Soc.* 99: 301-346.

- Inoue, N; Tobe, H. 1999. Integumentary studies in Menyanthaceae (Campanulales sensu lato). *Acta Phytotaxon Geobot* 50:75–79.
- Jeffrey, C. 2009. Evolution of Compositae flowers. En: Funk V, Susanna A, Stuessy TF, Bayer R, eds. *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*. Vienna: IAPT.
- Johansen, D. A. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc: Londres, p. 530, 1940.
- Johri, B. M. (ed.). 1984. *Embryology of Angiosperms*. Springer.
- Johri, B. M. K; Ambegaokar, B; Srivastava, P. S. 1992. *Comparative embryology of angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag.
- Kapil, R. N. & Tiwari, S. C. 1978. The integumentary tapetum. *Bot. Rev.* 44: 457–490.
- Katinas, L. & Stuessy, T. F. 1997. Revision of *Doniophyton* (Compositae, Barnadesioideae). *Pl. Syst. Evol.* 206: 33-45
- Keijzer, C. J. 1987. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. 1. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. *New Phytol.* 105: 487–498.
- Kirchhoff, B. K. 2003. Shape matters: Hofmeister's rule, primordium shape and flower orientation. *Int. J. Plant Sci.* 164(4):505–517.
- Kurtz da Costa, P. 2014. Aspectos da ontogenia, ginosporigênese, e ginogametogênese em *Dasyphyllum brasiliense* (Spreng.) Cabrera e *Schlechtendalia luzulifolia* Less. (Barnadesioideae, Asteraceae). Dissertacao de Maestrado, Universidad Federal de Santa Maria, RS, Brasil.
- Kurtz da Costa, P. & Oliveira, J. M. S. 2011. Caracterizacao estrutural do fruto de *Dasyphyllum brasiliense* (Spreng) Cabrera (Barnadesioideae, Asteraceae) com consideracoes evolutivas. *Iheringia, Série Botânica* 66: 277–282.
- Kwiatkowska, D. 2004. Structural litégration at the shoot apical meristem: models, measurements and experiments. *Am. J. Bot.* 91 (9): 1277–1293.
- Lakshmi P, S. & Pullaiah, T. 1986. Embryological investigations in *Centipeda minima* (Asteraceae). *PNAS, India Section B: Biological Sciences* 96: 141–146
- Leins, P. & Erbar, C. 2010. Flower and Fruit, Morphology, Ontogeny, Phylogeny, Function and Ecology. *Schweizerbart Science Publishers: Stuttgart*. (Chapter "The Floral Axis", pp. 101-113).
- Leong, F. J; Brady, M; McGee, J. O'D. 2003. Correction of uneven illumination (vignetting) in digital microscopy images. *J. Clin. Pathol.* 56: 619–621.
- Li, N; D.S. Zhang, H.S. Liu, C.S. Yin, X.X. Li, W.Q. Liang, Z. Yuan, B. Xu, H.W. Chu, J. Wang, T.Q. Wen, H. Huang, D. Luo, H. Ma, D.B. Zhang. 2006. The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* 18: 2999–3014

- Lopes, B. P. T & Oliveira, de S. J. M. 2015. Exine structure in *Dasyphyllum brasiliense* (Spreng.) Cabrera (Barnadesioideae-Asteraceae): aspects of development for identifying the cavea. *IHERINGIA*, Ser. Bot; Porto Alegre, vol.70 (1): 189-191.
- Lott, J. N. A. 1981. Protein bodies in seeds. *Nord. J. Bot.* 1: 421-432.
- Lundberg, J. & Bremer, K. 2003. A phylogenetic study of the order Asterales using one morphological and three molecular data sets. *Int. J. Pl. Sci.* 164: 553–578. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/374829>.
- Lundberg, J. 2009. Asteraceae and relationships within Asterlaes: en V.A. Funk, A. Susanna, T.F. Stuessy & R.J. Bayer (eds.). *Sistematics, evolution and biogeography of Compositae*, pp. 157-169, International Association for Plant Taxonomy (IAPT), Viena, Austria.
- Maheshwari, P. 1950. *An Introduction to embryology of Angiosperms*. McGraw-Hill Publishing Company Ltd. New Delhi, India.
- Maheshwari Devi, H. 1963. Embryological studies in Compositae. IV. Heliantheae, *Proc. Indian Acad. Sci.* 38: 274-290.
- Maheshwari Devi, H. 1957. Embryological studies in Compositae, III. *Gerbera jamesonii* Bolus," *Proc. Indian Acad. Sci.* 46: 68-74.
- Maldonado, S. & Lott, J. N. A. 1991. Protein bodies in *Datura stramonium* seeds: structure and mineral nutrient composition. *Can. J. Bot.* 69: 2345-2554.
- Mandel, J. R; Dikow, R. B; Siniscalchi, C. M; Thapa, R; Watson, L. E; Funk, V. A. 2019. A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. *PNAS.* 116 (28): 14083-14088.
- Manning, J. C. 1996. Diversity of endothelial patterns in the Angiosperms. In: D'Arcy, W. G: *The Anther: Form, Function and Phylogeny*. Cambridge University Press. ISBN 0521 48063 9.
- Mantese, A. I; Medan, D; Hall, A. J. 2006. Achene Structure, Development and Lipid Accumulation in Sunflower Cultivars Differing in Oil Content at Maturity. *Ann. Bot.* 97: 999–1010. DOI:10.1093/aob/mcl046
- Martin, A. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *Am. Midl. Nat.* 36:513-660.
- Marzinek, J; De-Paula, O. C; Oliveira, D. M. T. 2008. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Rev. Bras. Bot.* 31: 549–553.
- Marzinek, J. & Oliveira, D. M. 2010. Structure and ontogeny of the pericarp of six Eupatorieae (Asteraceae) with ecological and taxonomic considerations. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 82: 279–291.
- Mayer, S. S. & Charlesworth, D. 1991. Cryptic dioecy in flowering plants. *Trends Ecol Evol.* 6(10):320-5. DOI: 10.1016/0169-5347(91)90039-Z.

- Mello, M. C; Fior, C. S; Oliveira, J. M. S. 2009. Anatomia do fruto de *Schlechtendalia luzulifolia* Less. (Barnadesioideae, Asteraceae Bercht. & J. Presl). IHERINGIA, Sér. Bot; Porto Alegre. Vol 64(1): 77-80.
- Morant, M; Jørgensen, K; Schaller, H; et al; 2007. CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *Plant Cell* 19, 1473–1487
- Muchhala, N. 2003. Exploring the boundary between pollination syndromes: bats and hummingbirds as pollinators of *Burmeistera cyclostigmata* and *B. tenuiflora* (Campanulaceae). *Oecologia*134:373–380. DOI 10.1007/s00442-002-1132-0
- Muradian, L. G. 1991. Carpologic character of Calyceraceae family (en ruso). *Flora, rastitel'nost i rastit -el'nye resursy armenii*, Sborn. Nauch. Trud. 13: 85-95.
- Murphy, D. J. 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog. Lipid Res.* 32:247–280.
- Murphy, D. J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* 40: 325–438.
- Naghiloo, S. & Claßen-Bockhoff, R. 2017. Developmental Changes in Time and Space Promote Evolutionary Diversification of Flowers: A Case Study in Dipsacoideae. *Front. Plant Sci.* 8: 1665. DOI: 10.3389/fpls.2017.01665
- Nepi, M. & Franchi, G.G. 2000. Cytochemistry of Mature angiosperm pollen. *Plant Syst. Evol.* 222: 45-62.
- Nepi, M; Franchi, G. G; Pacini, E. 2001 Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma* 216: 171–180.
- North, A. J. 2006. *Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition*. *JCB.* 172 (1) 9-18; DOI: 10.1083/jcb.200507103.
- Newcomb, W. 1973. The development of the embryo of sunflower *Helianthus annuus* before fertilization. *Can. J. Bot.* Vol (51): 863-878.
- O'Brien, T. P; Feder, N; McCully M. E. 1964. Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59: 368. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01248568>.
- O'Brien, T. P. & McCully, M. E. 1981. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Melbourne : Termarcarphi.
- Olmstead, R.G; Michaels, H; Scott, K.M; Palmer, J. D. 1992. Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of rbcL. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 249–265.
- Olmstead, R. G; Ki-Joong, K; Jansen, R. K; Wagstaff, S. J. 2000. The Phylogeny of the Asteridae sensu lato Based on Chloroplast ndhF Gene Sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* Vol. 16, No. 1: 96–112. DOI:10.1006/mpev.1999.0769
- Oraei, M; Gohari, G; Esmailou, Z; Naghiloo, S. 2013. Comparative ontogeny of perfect and

- pistillate florets in *Senecio vernalis* (Asteraceae). *Flora* 208 (2013) 285–292.
- Owen H. A. & Makaroff, C. A. 1995. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185:7–21
- Pacini, E. 1996. Tapetum types in the Compositae: forms and function, in D.J.N. Hind, H.J. Beentje (Eds.), *Compositae: Systematics. Proceeding of the International Compositae Conference, Kew, 1994*, vol. 1, Royal Botanical Gardens, Kew (1996) pp. 21–28
- Pacini, E. 1997. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. *Can. J. Bot.* 75:1448–1459. DOI:10.1139/b97-859.
- Pacini, E. & Franchi, G. G. 1983. Pollen grain development in *Smilax aspera* L. and possible function of the loculus. In: Mulcahy DL, Ottaviano E (eds) *Pollen biology and implications in plant breeding*. Elsevier, New York, pp 183–190.
- Pacini, E; Franchi, G. G; Hesse, M. 1985. The tapetum: its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. *Pl. Syst. Evol.* 149: 155-185.
- Pacini, E; Guarnieri, M; Nepi, M. 2006. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma* 228: 73–77 DOI 10.1007/s00709-006-0169-z.
- Pacini E. & Juniper B. J. 1984. The ultrastructure of pollen grain development in *Lycopersicum peruvianon*. *Caryologia* 37: 21–50.
- Pacini, E; Keijzer, C. J. 1989. Ontogeny of intruding non-periplasmodial tapetum in the wild chicory, *Cichorium intybus* (Compositae). *Pl. Syst. Evol.* 167.
- Padin, A. L; Calviño, C. I; Ezcurra, C. 2015. Morfología y anatomía foliar comparada de *Chuquiraga* y géneros afines (Asteraceae). *Brittonia* 67, 150–165 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12228-015-9364-6>
- Paiva, J. G. A.; Frank-de-Carvalho, S. M; Magalhaes, M. P. & Graciana-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Bot. Brasil.* 20 (2): 257-264.
- Pandey, A. K. & Singh, R. P. 1980. Development and structure of seeds and fruits in tribe Vernonieae - some *Vernonia* and *Elephantopus* species. *Flora* 169: 443–452.
- Parish, R.W. & Li, S. F. 2010. Death of a tapetum: a programme of developmental altruism. *Plant Sci.* 178, 73-89.
- Parra, O; Marticorena, C. 1972. Granos de polen de plantas chilenas, II. Compositae–Mutisieae. *Gayana* 21, 9–13.
- Panero, J.L. & Crozier, B.S. 2016. Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 99: 116–132.

- Periasamy, K; Swamy, B. G. L. 1966. Morphology of the anther tapetum in Angiosperms. *Curr. Sci.* 35: 427–430.
- Pesacreta, T. C. & Stuessy, T. F. 1996. Autofluorescent walls of connective bases in anthers of Barnadesioideae (Asteraceae), and systematic implications. *TAXON* 45.
- Piffanelli, P; Ross, J. H. E; Murphy, D. J. 1997. Intra and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant J.* 11:549–652.
- Piffanelli, P; Ross, J. H. E; Murphy, D. J. 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod.* (11): 65-80.
- Polevova, S. 2019. Sporoderm ultrastructure and development in *Aristolochia manshuriensis* Komarov (Aristolochiaceae). *Grana*, 58:5, 337-349, DOI: 10.1080/00173134.2019.1624979.
- Pozner, R. 1993. El androsporangio, la androsporogénesis y la androgametogénesis de *Cayaponia citrullifolia*, *C. bonariensis* y *Cucurbitella duriaei* (Cucurbitaceae). *Darwiniana* 32 (1-4): 109-123.
- Pozner, R. E. 2001. Approach to the early sporangial development in angiosperms considering meiosis control and cellular differentiation. *Plant Syst. Evol.* DOI: 10.1007/s006060170003
- Pozner, R. & Cocucci, A. 2006. Floral structure, anther development and pollen dispersal of *Halophytum ameghinoi* (Halophytaceae). *Int. J. Plant Sci.* 167(6): 1091–1098.
- Pozner, R; Zanotti, C; Johnson, L. 2012. Evolutionary origin of the Asteraceae capitulum: insights from Calyceraceae. *Am. J. Bot.* 99 (1): 1-13.
- Prahl, A.K; Springstube, H; Grumbach, K; Wiermann, R. 1985. Studies on sporopollenin biosynthesis: The effect of inhibitors of carotenoid biosynthesis on sporopollenin accumulation. *Z. Naturforsch.* 40c, 621–626.
- Pullaiah, T. 1978. Studies in the embryology of Compositae. III. The tribe Astereae. *Bot Mag Tokyo* 91: 197–205.
- Pullaiah, T. 1979. Studies in the embryology of Compositae. IV. The tribe Inuleae. *Amer. J. Bot.* 66(10): 1119-1127.
- Pullaiah, T. 1981. Studies in the embryology of Heliantheae (Compositae). *Plant Systematics and evolution.* Vol 137: 203-214.
- Pullaiah, T. 1983. Studies in the Embryology of Senecioneae (Compositae). *Plant Systematics and evolution.* Vol 142: 61-70.
- Pullaiah, T. 1984. Embryology of Compositae. *International Bioscience Monographs* Vol. 13. Today's and Tomorrow's Printers & Publishers. New Delhi. India.
- Punt, W; P.P. Hoen; S. Blackmore; S. Nilsson & Le Thomas, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 143: 1-81.

- Quilichini, T. D; Grienenberger, E; Douglas, C. J. 2015. The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry* 113: 170–182.
- Reiche, K. 1900. Beiträge zur Systematik der Calyceraceen. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 29: 107-119, Taf. 1.
- Richards, A. J. 1997. *Plant Breeding Systems*. 2nd edition. Springer, London. ISBN 978-0-412-57440-5.
- Robinson, H. 2009. An introduction to micro-characters of Compositae. En: Funk V, Susanna A, Stuessy TF, Bayer R, eds. *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*. Vienna: IAPT.
- Ronse de Craene, L. P. 2010. *Floral Diagrams: an Aid to understanding flower morphology and evolution*. Cambridge University Press.
- Rossner, M. & Yamada, K. M. 2004. What is in picture? The temptation of image manipulation. *J. Cell Biol.* 166 (1) 11-15. DOI: 10.1083/jcb.200406019.
- Roth, I. 1977. *Fruits of angiosperms*. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Rowley, J. R. & Southworth, D. 1967. Deposition of sporopollenin on lamellae of unit membrane dimensions. *Nature* 213:703–704
- Ruzin, S. E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press.
- Russell, S. D. & Jones, D. S. 2015. The male germline of angiosperms: repertoire of an inconspicuous but important cell lineage. *Front. Plant Sci.* 6: 173. DOI: 10.3389/fpls.2015.00173.
- Saavedra, M. M; Franklin Guimaraes, E; Loeuille, B; Campostrini Forzza, R. 2018. Taxonomic Revision of *Dasyphyllum* sect. *Macrocephala* (Asteraceae: Barnadesioideae). *Syst. Bot.* 43(1): 297-315.
- Sagástegui-Alva, A; Dillon, M. O. 1985. Four new species of Asteraceae from Peru. *Brittonia* 37 (1): 6-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02809659>.
- Sagástegui Alva, A. & Sánchez Vega, I. 1991. Una nueva especie de *Chuquiraga* (Asteraceae–Mutisieae) del Norte del Perú. *Arnaldoa* 1: 1–4.
- Sagástegui Alva, A. 1980. Compuestas andino-peruanas nuevas para la ciencia. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 19, 61–68.
- Sakai, S; Suzuki, Y; Itagaki, T; Tsujisawa, H; Makino, T. 2008. On the function of hermaphrodite florets in female inflorescences in *Petasites japonicus* (Asteraceae). *Botany* 86: 213–217.
- Sanders, P. M; Bui, A. Q; Weterings, K; McIntire, K. N; Hsu, Y. C, Lee, P. Y, Truong, M. T; Beals, T. P; Goldberg, R. B. 1999. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod* 11: 297–322. DOI: 10.1007/s004970050158.

- Santos de Oliveira, J. M; Saldanha Martins, M; Paludette Dorneles, M; Carvalho de Freitas, C. 2015. Starch distribution in anthers, microspores and pollen grains in *Aechmea recurvata* (Klotzsch.) L.B.Sm; *Dyckia racinae* L.B.Sm. and *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (Bromeliaceae). Acta Bot. Brasil. 29 (1): 103-112. DOI: 10.1590/0102-33062014abb3698.
- Sattler, R. 1973. Organogenesis of flowers. A photographic text-atlas. University of Toronto Press.
- Sauquet, H; Doyle, J. A; Scharaschkin, et al. 2003. Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. Bot. J. Linn. Soc. 142: 125–186.
- Schmid, R. 1986. On Cornerian and Other Terminology of Angiospermous and Gymnospermous Seed Coats: Historical Perspective and Terminological Recommendations. TAXON Vol (35): 476-491. IAPT.
- Schnarf, K. 1931. Vergleichende Embryologie der Angiospermen. Bornträger, Berlin.
- Schneitz, K; Hulskamp, M; Kopczak, S. D; Pruitt, R. E. 1997. Dissection of sexual organ ontogenesis: a genetic analysis of ovule development in *Arabidopsis thaliana*. Development 124: 1367–1376
- Schneitz, K; Balasubramanian, S; Schiefthaler, U. 1998. Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. Trends Plant Sci. 3: 468–472
- Scott, R. J. Spielman, M; Dickinson, H. G. 2004. Stamen Structure and Function. The Plant Cell, Vol. 16, S46–S60
- Scott, R. J. 1994. Pollen exine: the sporopollenin enigma and the physics of pattern. In: Scott R. J, Stead, A. D (eds). Molecular and cellular aspects of plant reproduction. Cambridge University Press, Cambridge, pp 49–81.
- Sharma, H. P. & Murty, Y. S. 1978. Embryological studies in the Compositae Astereae-II. PNAS, India. Section B: Biological Sciences 87: 149.
- Sheldon, J. M; Dickinson, H. G. 1983. Determination of patterning in the pollen wall of *Lilium henryi*. J. Cell Sci. 63: 191–208.
- Shi, B. & Vernoux, T. 2018. Patterning at the shoot apical meristem and phyllotaxis. Current Topics in Developmental Biology. ISSN 0070-2153. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.10.003>
- Skinner, D. J. & Gasser, C. S. 2009. Expression-based discovery of candidate ovule development regulators through transcriptional profiling of ovule mutants. BMC Plant Biology 9: 29. DOI:10.1186/1471-2229-9-29
- Skvarla, J. J; Turner, B. L; Patel, V. C; Tomb, S. 1977. Pollen morphology in the Compositae and in morphologically related families. In: Heywood, V; Harborne, J. B; Remes, B.L.

- (Eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press, London, 1, pp. 141–248.
- Small, J. 1918. The origin and development of the Compositae. V. The pappus. *New Phytol. Reprint*, 11, 98–123.
- Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2016. Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 30:159–165.
- Soltis, D.E; Soltis, P.S; Chase, M.W; Mort, M.E; Albach, D.C; Zanis, M; Savolainen, V; Hahn, W.H; Hoot, S.B; Fay, M.F; Axtell, M; Swensen, S.M; Prince, L.M; Kress, W.J; Nixon, K.C; Farris, J.S. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcl* and *atpB* sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 133: 381–461.
- Sood, S. K. & Thakur, T. S. 1985. Development of male and female gametophytes and integument initiation in *Prenanthes brunoniana* Wall. (Compositae). *Proceedings: Plant Sci. Vol (94): n 4-6*, 553-559.
- Southworth, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 73-80.
- Stanley, R. G. & Linskens, H. F. 1974. *Pollen, biology, biochemistry, management*. Springer Verlag, Berlin.
- Stevens, P. F. 2001 onwards. *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since].
- Stuessy, T. F. & Urtubey, E. 2006. Phylogenetic implications of corolla morphology in subfamily Barnadesioideae. *Flora*. 201 (5): 340-352.
- Stuessy, T. F; Urtubey, E; Gruenstaeudl M. 2009. Barnadesioideae. In: Funk V, Susanna A, Stuessy TF, Bayer R, eds. *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*. Vienna: IAPT.
- Stuessy, T. F; Sagástegui Alva, A. 1993. Revisión de *Arnaldoa* (Compositae, Barnadesioideae) género endémico del norte del Perú. *Arnaldoa Vol. 1 (4)*: 9-21.
- Stuessy, T. F; Sang, T; DeVore, M, L. 1996. Phylogeny and biogeography of the subfamily Barnadesioideae with implications for early evolution of the Compositae. Pp. 463-490 in *Compositae: Systematics*. Vol. I, eds. D. J. Hind and H. Beentje. Proc. International Compositae Conference, Kew, 1994. Kew: Royal Botanic Garden.
- Sundara Rajan, S. 1968. Embryological studies in Compositae. Floral morphology, sporogenesis and gametogenesis in *Emilia sonchifolia* (Linn.) D.C. *Curr. Sci.* 37: 26–28.
- Sun, M. & Ganders, F. R. 1987. Microsporogenesis in male sterile and hermaphroditic plants of nine gynodioecious taxa of Hawaiian *Bidens* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 74 (2): 209-217.
- Susanna, A; Baldwin, B. G; Bayer, R. J; Bonifacino, J. M; Garcia-Jacas, N; Keeley, S. C;

- Mandel, J. R.; Ortiz, S; Robinson, H; Stuessy, T. F. 2020. TAXON 00 (00) 1-8. The Clasification of the Compositae: a tribute to Vicki Ann Funk (1947-2019). DOI <https://doi.org/10.1002/tax.12235>
- Svoma, E; Mayer, V; Stuessy, T. F; Urtubey, E. 2019. Staminal features in Barnadesioideae (Asteraceae): description, evolution and function. Bot. J. Linn. Soc. 192 (3):474-497.
- Tank, D.C. & Donoghue, M. J. 2010. Phylogeny and phylogenetic nomenclature of the Campanulidae based on an expanded sample of genes and taxa. Syst. Bot. 35: 425–441.
- Teeri, T. H; Uimari, A; Kotilainen, M; Laitinen, R; Help, H; Elooma, P; Albert, V. 2006. Reproductive meristem fates in *Gerbera*. J. Exp. Bot. 57 (13): 3445-3455. Major Themes in Flowering Research Special Issue.
- Telleria, M. C; Palazzesi, L; Barreda, V. 2015. Evolutionary significance of exine ultrastructure in the subfamily Barnadesioideae (Asteraceae) in the light of molecular phylogenetics. Rev. Palaeobot. Palynol. 221: 32-46.
- Tobe, H. 1989. The embryology of Angiosperms: Its broad application to the Systematic and Evolutionary study. Bot. Mag. Tokyo. 102: 351-367.
- Tobe, H. & Morin. N. R. 1996. Embryology and circumscription of Campanulaceae and Campanulales: A review of literature. J. Plant Res. 109: 425-435.
- Torices, R; Méndez, M; Gómez. J. M. 2011. Where do monomorphic sexual systems fit in the evolution of dioecy? Insights from the largest family of angiosperms. New Phytol. 190: 234–248
- Torices, R. & Anderberg. A. A. 2009. Phylogenetic analysis of sexual systems in Inuleae (Asteraceae). Am. J. Bot. 96 (5): 1011–1019
- Tucker, S.C; 1988. Heteromorphic flower development in *Neptunia pubescens*, amimosoid legume. Am. J. Bot. 75, 205–224.
- Uimari, A; Kotilainen, M; Elomaa, P; Yu, D; Albert, V. A; Teeri, T. H. 2004. Integration of reproductive meristem fates by a SEPALLA-like MADS-box gene. PNAS November 2, vol. 101 no. 44 15817–15822.
- Ulloa, U. C; Jørgensen, P. M; Dillon, M. O. 2002. *Arnaldoa argentea* (Barnadesioideae; Asteraceae), a new species and a new generic record for Ecuador. Novon 12, 415–419.
- Urtubey, E. 1997. Morfología dle polen de Barnadesia (Asteraceae, Barnadesioideae). Bol. Soc. Argent. Bot. 33 (1-2): 69-75
- Urtubey, E. 1999. Revisión del género *Barnadesia* (Asteraceae, Barnadesioideae). Ann. Missouri Bot. Gard. 86: 57-117.
- Urtubey, E. & Stuessy, T. 2001. New hypotheses of phylogenetic relationships in Barnadesioideae (Asteraceae) based on morphology. TAXON 50.

- Urtubey, E. & Telleria, M. C. 1998. Pollen morphology of the subfamily Barnadesioideae (Asteraceae) and its phylogenetic and taxonomic significance. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 104: 19–37.
- Van Aelst, A; Pierson, E; Van Went, J; & Cresti, M. 1993. Ultrastructural changes of *Arabidopsis thaliana* pollen during final maturation and rehydration. *Zygote*, 1(2), 173-179. DOI:10.1017/S096719940000143X.
- Van Went, J. L. 1974. The ultrastructure of Impatiens pollen. In: Linskens HF (ed) Fertilization in higher plants. North Holland, The Netherlands, pp 81–88
- Venkateswarlu, J. & Maheswari Devi, H. 1955. Embryological studies in Compositae, I. *Launaea pinnatifida* Cass. *Proc. Ind. Acad. Sci.* Vol (41): 38-46
- Vijverberg, K; Welten, M; Kraaij, M; van Heuven, B. J; Smets, E; Gravendeel, B. 2021. Sepal identity of the pappus and floral organ development in the common dandelion (*Taraxacum officinale*; Asteraceae). *Plants* 2021, 10, 1682. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10081682>.
- Villanueva, J. M; Broadhvest, J; Hauser, B. A; Meister, R. J; Schneitz, K; Gasser, C. S. 1999. INNER NO OUTER regulates abaxial–adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. *Genes and Development* 13: 3160–3169.
- Villari, R. Embryology of *Helycrisum rupestre* (Rafin.) DC var. *messerii Pignatti* (Inuleae, Asteraceae). 1987. *J. Soc. Bot. Ital.* Vol (121): 27-40.
- Vogel, S. 2015. Vertebrate Pollination in Compositae: Floral syndromes and field observations. *STAPFIA* 103: 5-26.
- Wallace, S; Fleming, A; Wellman, C. H; Beerling, D. J. 2011. Evolutionary development of the plant and spore wall. *AoB Plants*.
- Weber, M. & Ulrich, S. 2010. The endexine: a frequently overlooked pollen wall layer and a simple method for detection. *Grana*, 49:2, 83-90, DOI: 10.1080/00173131003743949.
- Weberlin, F. 1989. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press.
- Wetzel, C. L. R. & Jensen, W. A. 1992. Studies of pollen maturation in cotton: the storage reserve accumulation phase. *Sex Plant Reprod.* 5:117–127.
- Wilson, Z. A; Song, J; Taylor, B; Yang, C. 2011. The final split: the regulation of anther dehiscence. *J. Exp. Bot.* 62 (5): 1633-1649.
- Wilson, Z. A. & Zhang, D. 2009. From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *J. Exp. Bot.* 60 (5): 1479-1492.
- Wodehouse, R. P. 1928. Pollen grains in the identification and classification of plants II. *Barnadesia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club.* 55 (8): 449-462.
- Wodehouse, R.P; 1935. *Pollen Grains*. McGraw-Hill, New York, pp. 468–472, 574 pp.

- Yankova-Tsvetkova, E, P; Yurukova-Grancharova, P; Baldjiev, G; Vitkova, A. 2016. Embryological features, pollen and seed viability of *Arnica montana* (Asteraceae) a threatened endemic species in Europe. *Acta. Bot. Croat.* 75 (1): 39-44.
- Yankova-Tsvetkova E, P; Yurukova-Grancharova, P. D. & Vladimirov, V. D. 2017. Embryology of Two Invasive Alien Species of *Solidago* L. (Asteraceae) in the Bulgarian Flora. *Acta Zool. Bulg. Suppl.* 9: 53-59.
- Yeung, E. C; Oinam, G. S; Yeung, S. S; Harry, I. 2011. Anther, pollen and tapetum development in safflower, *Carthamus tinctorius* L. *Sex Plant Reprod.* DOI 10.1007/s00497-011-0168-x.
- Yu, D; Kotilainen, M; Pollanen, E; Metho, M; Elomaa, P; Helariutta, Y; Albert, V. A; Teeri, T. H. 1999. Organ Identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *TPJ.* 17(1): 51-62.
- Yurukova-Grancharova, P. D. 2004. On the embryology of *Leontodon autumnalis* (Asteraceae). *PHYTOLOGIA BALCANICA* 10(1) : 85-91.
- Yurukova-Grancharova, P; Robeva-Davidova, P; Vladimirov; V. 2006 On the embryology and mode of reproduction of selected diploid species of *Hieracium* s.l. (Asteraceae) from Bulgaria. *FLORA* 201 (2006) 668-675.
- Yurukova-Grancharova, P; Yankova-Tsvetkova, E; Vladimirov, V. 2013. Reproductive features of three invasive alien species of *Erigeron* (Asteraceae) in Bulgaria. *Comptes rendus de l'Academie bulgare de Sciences.* Tome 66, No 2.
- Zardini, E. M. & Soria, N. 1994. A new species of *Dasyphyllum* (Asteraceae–Mutisieae) from Paraguay. *Novon* 4, 80–82.
- Zhang, T; Cieslak, M; Owens, A; Wang, F; Broholm, S. V; Teeri, T. H; Elomaa, P; Prusinkiewicz, P. 2021. Phyllotactic patterning of *Gerbera* flower heads. *PNAS* 2021 Vol. 118 No. 13. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.201630411>.
- Zhang, D; Luo, X; Zhu. 2011. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. *Journal of Genetics and Genomics.* 38: 379-390.
- Zhao, Z; Skvarla, J. J; Jansen, R. K; De Vore, M. L. 2000. Phylogenetic Implications of Pollen Morphology and Ultrastructure in The Barnadesioideae (Asteraceae). *LUNDELLIA* (3): 26-40.
- Zhao, Y; Zhang, T; Broholm, S. K; Tähtiharju, S; Mouhu, K; Albert, V. A; Teeri, T. H; Elomaa, P. 2016. Evolutionary co-option of floral meristem identity genes for patterning of the floral-like Asteraceae inflorescence. *Plant. Physiol.* 172, 284-296.
- Zhenzhen, F; Jing, Y; Xiaowei, C; Xu, Z; Jie, Y; Mingjiao, C; Zongyun, L; Dabing, Z; Wanqi, L. 2014. The Rice basic Helix-Loop-Helix Transcription factor TDR INTERACTING PROTEIN2 is a central switch in early Anther Development. *The Plant Cell* Vol 26: 1512-1524.

Zarlavsky, G. E. 2014. Histología vegetal. Técnicas simples y complejas. 1ed. Buenos Aires. Sociedad Argentina de Botánica.