

MICROSPOROGENESIS EN *HYMENOCALLIS CARIBAEA* (L.) HERB. (AMARYLLIDACEAE)

Microsporogenesis in *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. (Amaryllidaceae)

María B. RAYMÚNDEZ U., Marcia ESCALA J.
y Nereida XENA de ENRECH

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental, Centro de Botánica Tropical, Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela
maria.raymundez@ciens.ucv.ve

RESUMEN

El objetivo de esta investigación embriológica, la primera realizada en el género, fue tipificar el proceso de microsporogénesis en *Hymenocallis caribaea*. La meiosis se desarrolla cuando los botones florales aún se encuentran dentro del bulbo. La microsporogénesis sigue un patrón de tipo sucesivo, común en las monocotiledóneas. El proceso es asincrónico entre yemas de una misma inflorescencia (indeterminado o acrópeto), anteras de una misma flor, y entre el ápice y la base de la misma antera (basípeto). Las anteras poseen estomas, el tapete es de tipo ameboide o periplasmoidal y las células del endotecio no desarrollan engrosamientos en la pared, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de los representantes de la familia. El tapete invade tempranamente la cavidad de la antera y produce pollenkit, una secreción amarillenta de tipo lipídico que se deposita sobre los granos de polen maduros confiriéndoles propiedades adherentes. Las micrósporas son uninucleadas, con patrón de ornamentación incipiente al momento de ser liberadas de la tétrada. Los granos de polen son monocolpados, como en la mayor parte de las monocotiledóneas; la exina tiene un patrón de ornamentación denso en los extremos y un retículo más laxo en la zona central. Al momento de la dehiscencia de la antera el polen es binucleado, condición que se considera ancestral en las angiospermas junto a la presencia de estomas en las anteras.

Palabras clave: Amaryllidaceae, embriología, *Hymenocallis*, microsporogénesis, polen

ABSTRACT

An embryological investigation was undertaken for the first time in a member of the genus *Hymenocallis*, to describe the microsporogenesis in *Hymenocallis caribaea*. Meiosis takes place when flower buds are still inside the bulb. Microsporogenesis follows a successive type, common in monocots. The process is asynchronous between buds of the same inflorescence (undeterminate or acropetal), anthers of the same flower, and between the apex and the base of each anther (basipetal). Anthers have stomata, the tapetum is ameoboid, or periplasmoidal, and the endothecium doesn't develop wall thickenings, contrary to what happens in most family representatives. Tapetum invades anther cavity early and produces pollenkit, a yellowish lipid secretion which is deposited over the mature pollen grains giving them adherent properties. When released from tetrads, microspores are uninucleate and show an undeveloped pattern of wall sculpturing. Pollen grains are monosulcate as in most monocots; the exine shows a dense sculpturing pattern at the ends and a loose reticulum at

the central zone. At the time of anther dehiscence, pollen is binucleate, a condition which is considered ancestral within the angiosperms as is the presence of stomata in the anthers.

Key words: Amaryllidaceae, embryology, *Hymenocallis*, microsporogenesis, pollen

INTRODUCCIÓN

La familia Amaryllidaceae ha sido objeto de numerosas investigaciones embriológicas. Sobre la base de las revisiones realizadas por Stenar (1951), Davis (1966), Dutt (1970), Ravikumar & Nair (1982) y Dahlgren *et al.* (1985), el modelo propuesto para el proceso de microsporogénesis es uniforme para toda la familia, presentándose escasas excepciones sobre el patrón general de microsporogénesis sucesiva con tétradas tetragonales. Ésta es la primera vez que se aborda un estudio embriológico en *Hymenocallis* Salisb.; así pues, el objetivo del presente trabajo es tipificar el proceso de microsporogénesis en *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb., comparándolo con los patrones ya conocidos en las monocotiledóneas y en otros representantes de la familia Amaryllidaceae.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se escogió a *H. caribaea*, especie de origen caribeño introducida en Venezuela, por su fácil acceso, pues se utiliza de forma extensa en el ornato público y privado de muchas ciudades del país debido a su valor ornamental y resistencia.

La investigación abarca únicamente las etapas del desarrollo previas a la fertilización. Se recolectaron 80 inflorescencias en los jardines de la Universidad Central de Venezuela, en Caracas. El material consistió de botones florales en diferentes estados de desarrollo, desde aquéllos donde comenzaban a diferenciarse las anteras y los óvulos aún estaban en una fase muy incipiente (de primordios), hasta los botones maduros y listos para la antesis.

Debido a que en las Amaryllidaceae el proceso meiótico generalmente se desarrolla cuando la inflorescencia aún está en el interior del bulbo, los mismos fueron examinados *in situ* para recolectar los botones evitando extraerlos del suelo. Para ello, se dejó parcialmente expuesta la yema apical con la ayuda de unas pinzas largas y estrechas, forzando un poco la separación y apertura de los primordios foliares y hojas, para seguir la formación de la inflorescencia sin alterar el crecimiento vegetativo de la planta. Una vez que asomaba el ápice de las dos brácteas más externas que rodean la inflorescencia, la planta era marcada con cinta para su recolección al día siguiente, justo cuando comenzara a emerger debido al inicio de la expansión del escapo floral. De esta forma se evitó la extracción innecesaria de gran cantidad de bulbos (Raymúndez 1997).

Los botones florales se fijaron en solución de Farmer (3:1 etanol absoluto:ácido acético glacial) durante un período de tres a cuatro semanas. Posteriormente, se disecaron para exponer las anteras (Raymúndez 1997).

Se siguió el protocolo para el estudio embriológico descrito por Johansen (1940), con las modificaciones en el procedimiento de deshidratación y rehidratación alcohólica y de montaje propuestas por Sánchez (1995) y Raymúndez (1997). Las anteras fueron procesadas por dos vías: mediante la preparación de láminas seriadas de cortes longitudinales y transversales de anteras incluidas en parafina, obtenidos al micrótopo de rotación (Johansen 1940; Sánchez 1995), y a través de la disección directa de anteras bajo un microscopio estereoscópico, cortándolas transversal o longitudinalmente con una aguja de punta biselada y drenándolas hacia el medio de montaje. La coloración se realizó con carbolfuchsin modificada o con azul de toluidina. Las muestras fueron preparadas de forma semipermanente, utilizando como medio de montaje la mezcla glicerina-gelatina 50% (Raymúndez 1997).

Las láminas producidas a partir de cortes seriados al micrótopo de rotación fueron evaluadas sistemáticamente, manteniendo el orden en el que fueron cortadas y montadas. Las láminas hechas a mano alzada fueron ordenadas y evaluadas según la etapa de la microsporogénesis en la que se encontraban. Las observaciones y fotomicrografías fueron realizadas en un microscopio Nikon Optiphot 2, con cámara automática y cámara de video incorporadas.

RESULTADOS

La meiosis en las anteras comienza cuando los botones florales están profundamente inmersos dentro del bulbo. El desarrollo de la inflorescencia es indeterminado, formándose de 10-16(18) yemas florales en cada una, con desarrollo centrípeto; cuando en los botones florales más externos las anteras se encuentran en las últimas fases de la microsporogénesis (tétradas y polen uninucleado sin deposición completa de la exina), las anteras de los botones florales centrales no han comenzado aún la meiosis (tejido esporógeno indiferenciado y microsporocitos).

Asimismo, hay desfase en el desarrollo de la microsporogénesis no sólo entre flores de la misma inflorescencia, sino entre anteras de la misma flor, y entre el ápice y la base de una misma antera. La asincronía entre las anteras de una flor depende de la posición de éstas con respecto al perianto; los tres estambres episépalos (adnatos a los lóbulos calicinos del perigonio tepaloideo) son más precoces en su desarrollo que los tres internos epipétalos. Dentro de una misma antera, la asincronía viene dada por una diferenciación basípeta, es decir, el ápice de la antera madura más tempranamente que la base. Esta asincronía es común a otras especies del género (*H. bolivariana*, *H. lobata*, *H. tubiflora*, *H. venezuelensis*) en las que se han realizado observaciones reproductivas (M. Raymúndez, datos no publ.). En la madurez de los botones florales, justo antes de la antesis, todas las anteras de la flor se sincronizan entre y dentro de sí y alcanzan el grado máximo de desarrollo, preparándose para la dehiscencia.

Las anteras de *H. caribaea* son largas, versátiles, tetrasporangiadas, de dehiscencia longitudinal, al igual que en otras especies del género. Cuando inma-

duras son de color blanco cremoso o verdoso, tornando a amarillo-naranja en la madurez por deposición de pollenkit sobre los granos de polen maduros y sobre las paredes internas de la cavidad del microsporangio. Esta deposición lipídica es originada por las células del tapete (Fig. 1) y secretada en la última fase de la microsporogénesis.

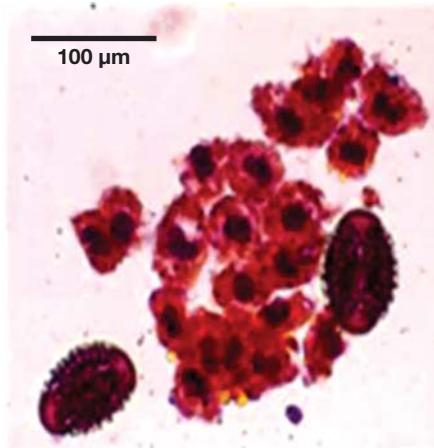


Fig. 1. *H. caribaea*. Células del tapete periplasmoidal uni- y binucleadas de secretando pollenkit y rodeando a granos de polen. Nótese la formación del plasmodio en la zona inferior del tapete liberado a la cavidad de la antera (60 ×).

Las anteras inmaduras presentan epidermis unistrata, con estomas dispersos; las células epidérmicas poseen paredes celulares delgadas, con la pared periclinal externa algo más gruesa. Le sigue el endotecio constituido por células de paredes delgadas, y luego un número variable (1 a 5) de capas parietales con amiloplastos abundantes (Fig. 2). La capa más interna de la pared de la antera, el tapete, es de tipo ameboide o periplasmoidal, constituido inicialmente por una sola capa de células uni o binucleadas, con citoplasma prominente y paredes celulares delgadas; comienza a desintegrarse muy tempranamente (durante la profase I de la meiosis) separándose inicialmente del resto de las capas de la pared de la antera (Fig. 3), luego de lo cual los protoplastos protruden en la cavidad interna del microsporangio (Fig. 4), fusionándose entre sí gran parte de ellos, formando un plasmodio cenocítico que rodea a las células madre y luego a los granos de polen (Fig. 1).

Durante el desarrollo y maduración de la antera se mantiene la estructura de las paredes, a excepción del tapete, que sufre los cambios drásticos explicados anteriormente. Las capas parietales se vuelven proliferativas en la zona de convergencia de los dos lóculos, mientras se mantiene un sólo estrato en la zona por donde ocurrirá la dehiscencia. Estas capas se van obliterando a medida que avanza el desarrollo de la antera (Fig. 4) y van perdiendo gradualmente su contenido de almidón, mientras que los protoplastos de las células del tapete se van haciendo más prominentes (Fig. 5).

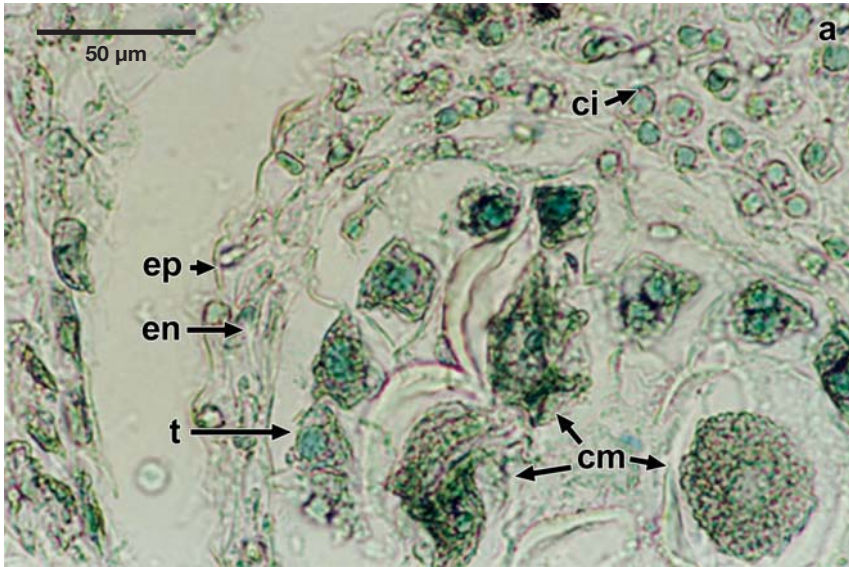


Fig. 2. *H. caribaea*. Corte transversal de una antera mostrando la epidermis (ep), endotecio (en), capas intermedias (ci), tapete (t) y células madre de las micrósporas (cm) (300 ×).

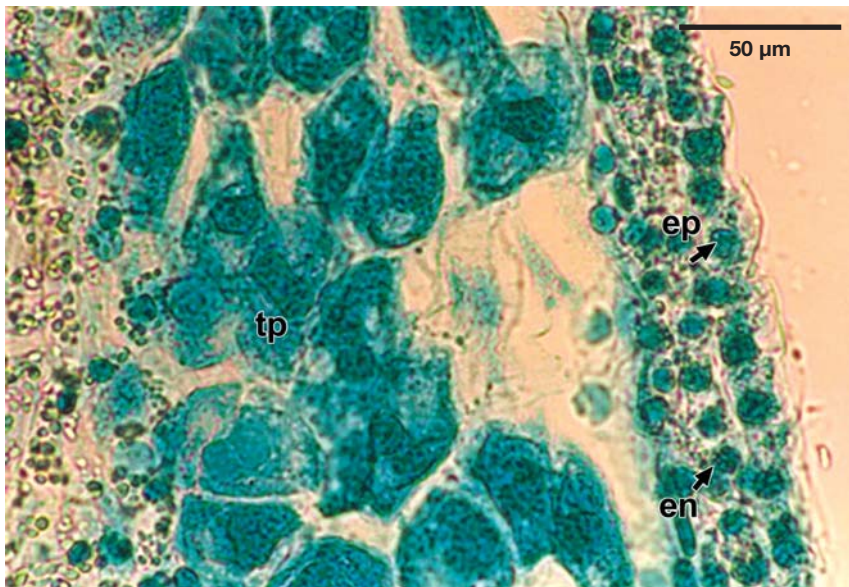


Fig. 3. *H. caribaea*. Corte paradérmico de una antera mostrando células del tapete (tp) que comienzan a perder cohesión tisular y se separan del resto de la pared de la antera; epidermis (ep), endotecio (en) (300 ×).

El tejido esporógeno está constituido por una masa indiferenciada de células esféricas, grandes, de paredes muy delgadas y lábiles, inconspicuas, con citoplasma denso y prominente, y núcleo evidente en interfase (Fig. 6).

El inicio de la microsporogénesis está marcado por la deposición de una pared de calosa alrededor de cada uno de los microsporocitos que constituyen el tejido esporógeno, individualizándolos y aislándolos entre sí. Una vez concluido este evento, se produce la meiosis (Fig. 5, 7-12).

Las células madre de las micrósporas son de grandes dimensiones (80-100 mm de diámetro); presentan forma esférica, a veces ligeramente poligonal, con paredes de calosa prominentes, de aproximadamente 9-10 mm de espesor; durante las distintas etapas de la profase I muestran un núcleo con un solo nucléolo prominente.

La meiosis masculina en *H. caribaea* es del tipo sucesivo, formándose claramente una lámina ecuatorial de calosa que separa dos regiones bien definidas en las células madre de las micrósporas al finalizar la telofase I, dando origen a una díada (Fig. 10). Al llegar a la telofase II, se forma una tétrada de células con disposición tetragonal (Fig. 11). Mientras avanza la meiosis las células del tapete han incrementado su contenido lipídico, presentan una vacuola prominente y un núcleo menos evidente.

Las micrósporas son liberadas de la tétrada al lóculo de la antera (microsporangio) con una pared celular en la que se puede observar el patrón de esculturación incipiente de la exina (Fig. 12) definido por la célula madre (gametofítico). En este momento las micrósporas son uninucleadas y permanecen así mientras culmina y se define la formación de la exina por deposiciones de origen esporofítico. Luego, la exina es cubierta por una deposición amarillo-naranja (Fig. 13), de composición lipídica, denominada pollenkit, originada por las células del tapete. El pollenkit confiere propiedades adherentes a los granos de polen y a él se debe también su color amarillo-naranja característico, que cambia de tonalidad desde el amarillo pálido hasta el naranja entre las distintas especies de *Hymenocallis* (M. Raymúndez, datos no publ.).

Antes de que se produzca la dehiscencia de la antera, en las micrósporas libres en el microsporangio ocurre la mitosis asimétrica que caracteriza el comienzo de la microgametogénesis. En el momento de la dispersión los granos de polen se encuentran en estado binucleado, formados por un núcleo vegetativo prominente y un núcleo espermático pequeño.

En la madurez, los granos de polen de *H. caribaea* son grandes (> 100 μ), monocolpados, heteropolares, bilaterales, de forma elipsoidal, y ligeramente arrañados en vista ecuatorial (proximal) (Fig. 14). La exina es dimórfica, mostrando un retículo laxo en la zona media, y un patrón mucho más fino y denso hacia los extremos (Fig. 14-15).

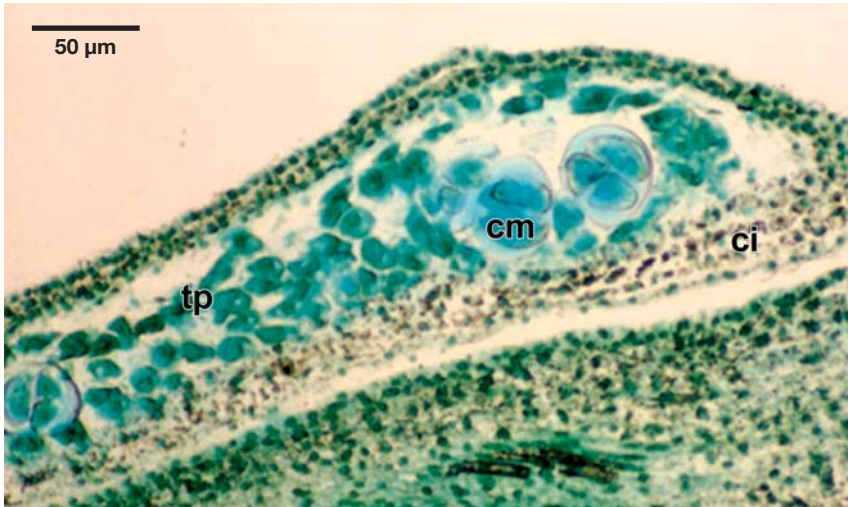


Fig. 4. *H. caribaea*. Corte longitudinal de la antera mostrando la obliteración parcial de las capas intermedias (ci) y liberación del tapete (tp) que invade el lóculo alrededor de las células madre (cm) (150 \times).

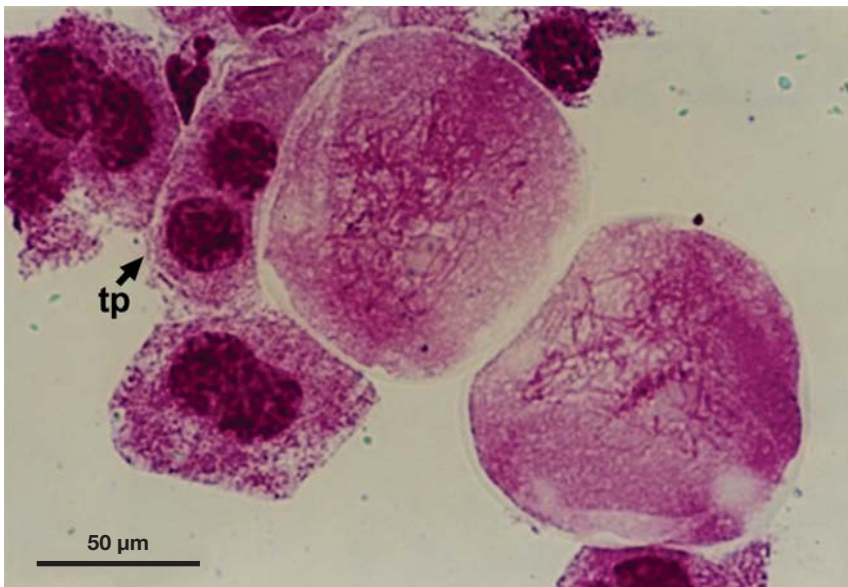


Fig. 5. *H. caribaea*. Células madre de las microsporas en profase I (leptoteno) rodeadas de células uni- y binucleadas del tapete (tp) libres de la pared de la antera (300 \times).



Fig. 6. *H. caribaea*. Masa de tejido esporógeno formada por microsporocitos carentes de pared celular de calosa, procedentes del interior de una antera (150 ×).



Fig. 7. *H. caribaea*. Célula madre de las micrósporas en metafase I, vista ecuatorial (900 ×).

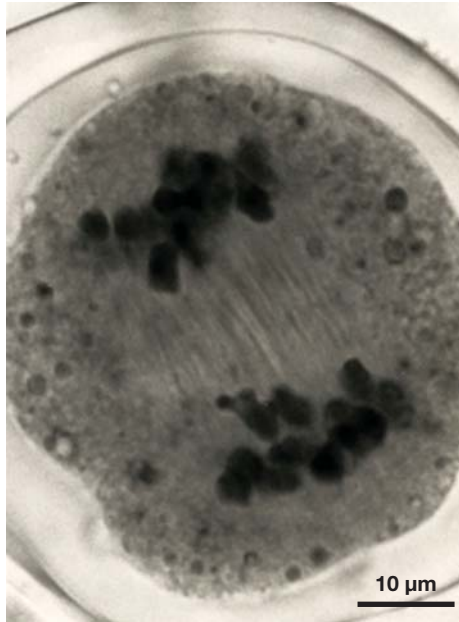


Fig. 8. *H. caribaea*. Célula madre de las micrósporas en anafase I, vista ecuatorial (900 ×).

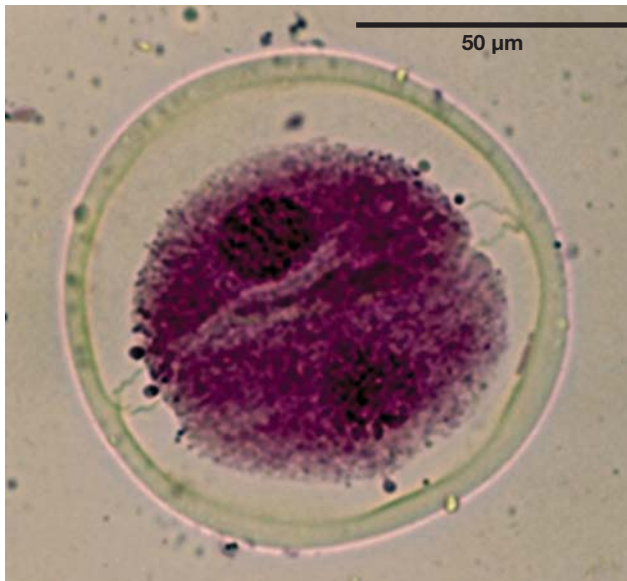


Fig. 9. *H. caribaea*. Célula madre de las micrósporas en interfase-profase II, vista ecuatorial; se observa el fragmoplasto recién formado dividiendo ambos protoplastos y la pared de calosa dividida (300 ×).



Fig. 10. *H. caribaea*. Célula madre de las micrósporas en estado de díada; la parte superior se encuentra en telofase II y la inferior en citocinesis (300 ×).

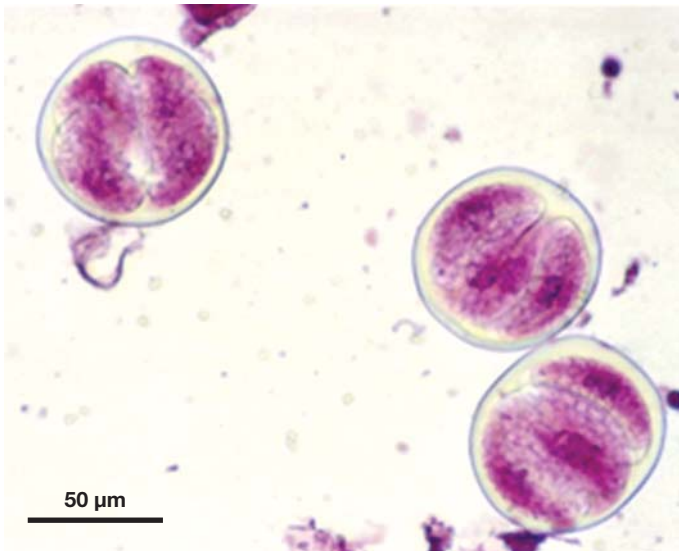


Fig. 11. *H. caribaea*. Células madre de las micrósporas en estado de tétrada tetragonal; se observa el patrón incipiente de esculpación de la pared de las micrósporas (de origen gametofítico) antes de ser liberadas de la tétrada (150 ×).

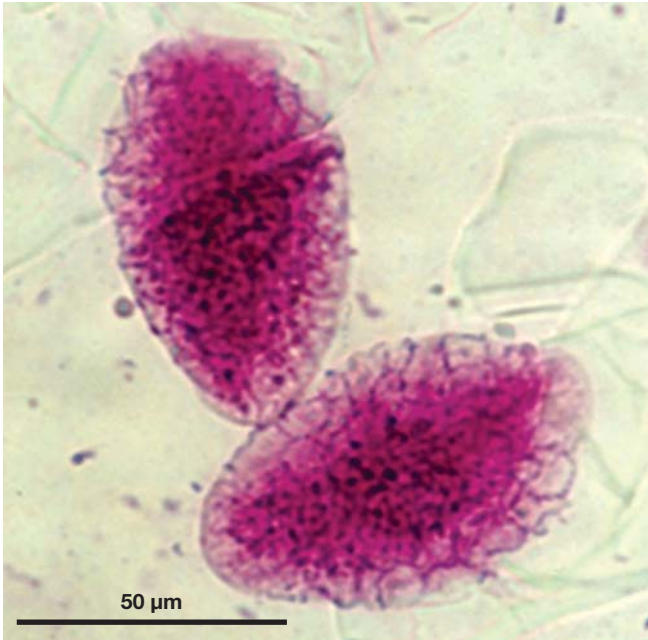


Fig. 12. *H. caribaea*. Micrósporas recién liberadas de la tétrada; se observa el patrón de esculpura incipiente de la exina que será luego característico en el grano de polen maduro (300 ×).

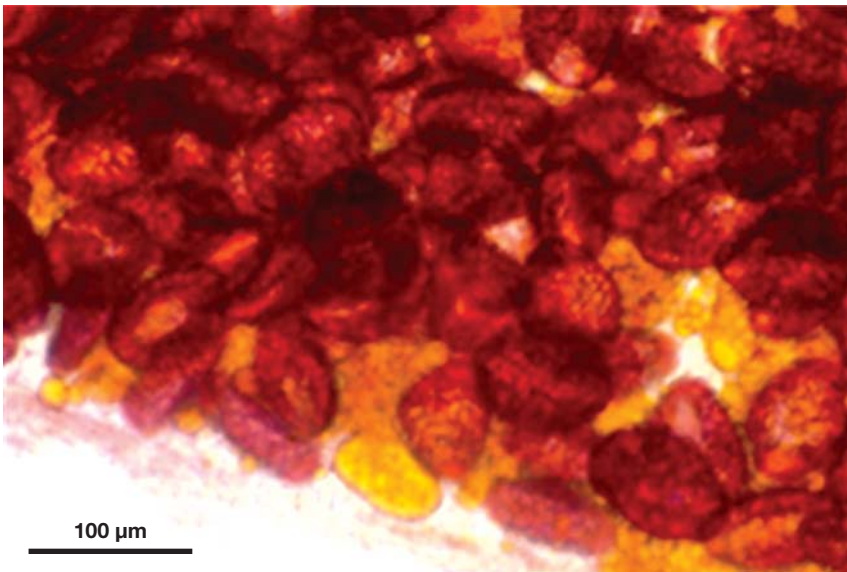


Fig. 13. *H. caribaea*. Micrósporas en el microsporangio rodeadas de pollenkit (60 ×).



Fig. 14. *H. caribaea*. Grano de polen monocolpado en estado uninucleado (microspora) en vista polar (600 ×).

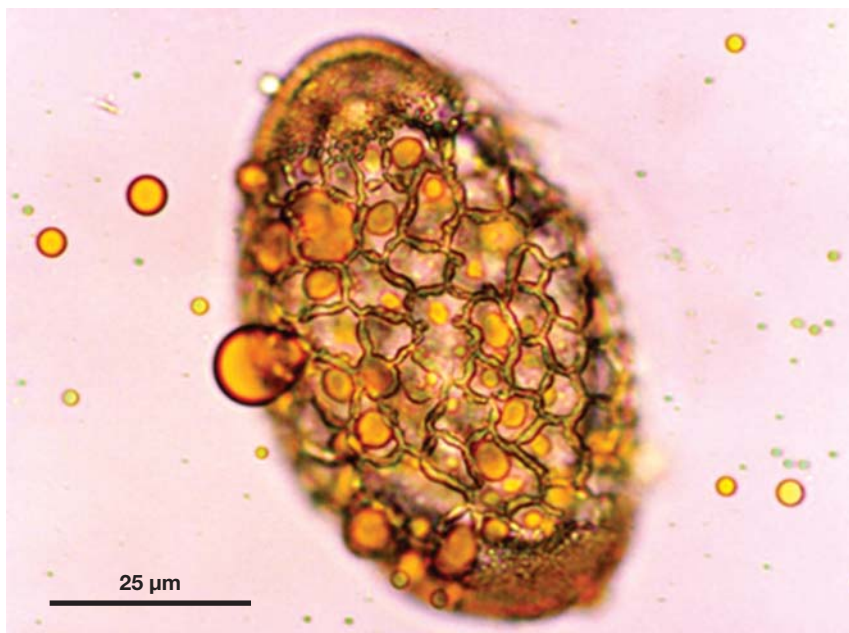


Fig. 15. *H. caribaea*. Grano de polen mostrando la exina de retículo laxo en la zona media y un patrón denso en los extremos. El patrón reticulado retiene gran cantidad de pollenkit que se aprecia como gotas anaranjadas (300 ×).

DISCUSIÓN

Si se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo con aquéllos reportados por Davis (1966), Dutt (1970) y Dahlgren *et al.* (1985), con relación al proceso de microsporogénesis en las Amaryllidaceae, se observa que de manera similar al resto de los miembros de la familia, *Hymenocallis caribaea* presenta microsporogénesis sucesiva. Los resultados concuerdan también en lo que respecta al estado binucleado en el que es liberado el polen al momento de la dehiscencia de la antera. Este comportamiento está considerado por Brewbaker (1967) como un carácter ancestral en las angiospermas en general, siendo la condición avanzada la liberación del polen en estado trinucleado.

Sin embargo, existen divergencias en ciertos aspectos del proceso con respecto a los referidos por la bibliografía. *H. caribaea* presenta un tapete ameboide o periplasmodial, en contraposición con el tipo de desarrollo del tapete descrito por Dutt (1970) para la familia Amaryllidaceae, y por Furness & Rudall (1998) para las Asparagales en general, quienes indican que el tapete característico para todo el orden es de tipo secretor. Dahlgren *et al.* (1985) y Davis (1966) también asignan el tipo de tapete secretor como típico de la familia, pero refieren excepciones del tipo ameboide en *Galanthus* L. El tapete periplasmodial o ameboide es el más común en las monocotiledóneas (Furness & Rudall 1998), por lo que este carácter pudiera representar una reversión hacia la condición ancestral, así como una diferencia genérica interesante a la hora de definir a *Hymenocallis* dentro de la familia.

Si se piensa en el papel funcional que tiene el tapete en la nutrición de las células madre, en la deposición de las capas externas de la exina sobre las micrósporas y en la síntesis de pollenkit (Hesse 1981; Knox 1984), la condición periplasmodial del tapete en *H. caribaea* favorece el desarrollo de estas funciones uniformemente alrededor de los granos de polen contenidos en el microsporangio.

La presencia de estomas en las anteras de *H. caribaea*, así como en el óvulo y la cubierta seminal (datos no mostrados), es considerada como evolutivamente primitiva dentro de las angiospermas y ocurre también en otros miembros de la familia (Dutt 1970).

Hymenocallis caribaea difiere de la mayoría de las Amaryllidaceae en la estructura anatómica de la antera; en esta especie, las paredes de las distintas capas que conforman la antera permanecen delgadas y celulósicas en la madurez y hasta el momento de la dehiscencia, en numerosos miembros de la familia es frecuente que el endotecio o alguna de las capas parietales intermedias desarrollen engrosamientos fibrosos (Davis 1966; Dahlgren *et al.* 1985).

En *H. caribaea* la meiosis no es sincrónica a lo largo de la antera, al igual que en otras especies de Amaryllidaceae como *Crinum flaccidum* Herb. (Howell & Prakash 1990); incluso, en *H. caribaea*, tampoco lo es entre microsporangios de una misma antera ni entre anteras de una misma flor. Dado que la asincronía que se presenta a diferentes niveles es común a otras especies del género *Hyme-*

nocallis (M. Raymúndez, datos no publ.), ésta sería otra característica que permite definirlo.

La morfología general del polen de *Hymenocallis caribaea* refleja también el patrón típico de la mayor parte de los miembros de la familia Amaryllidaceae (Dutt 1964; Dahlgren *et al.* 1985), mientras que la forma más o menos elipsoide del grano de polen, su gran tamaño y la exina dimórfica son comunes entre *H. caribaea* y otros miembros del género *Hymenocallis* (Ravikumar & Nair 1982; Roubik & Moreno 1991; Meerow & Dehgan 1985; Meerow *et al.* 2002).

En la mayoría de los géneros de la tribu Hymenocallideae para los que se conoce su morfología polínica, la reticulación central es muy laxa al igual que en *Hymenocallis*, a excepción de algunas especies de *Ismene* Salisb. ex Herb. donde el patrón se muestra más denso (Meerow & Dehgan 1985). La esculturación en los extremos forma en todos los casos estudiados una trama más cerrada. Otros caracteres variables en la tribu son el tamaño del grano de polen y el diámetro del lumen del retículo formado por la exina (Ravikumar & Nair 1982; Meerow & Dehgan 1988; Meerow *et al.* 2002).

La tribu Hymenocallideae se diferencia en la morfología del polen de la cercana tribu Eucharideae, por la ausencia en la mayor parte de los miembros de ésta última, del dimorfismo en la exina entre la porción central y los extremos del grano. El género *Urceolina* Rchb. representa una excepción, porque es el único que comparte el dimorfismo en la esculturación con las Hymenocallideae, considerándose este carácter una condición simplesiomórfica (Meerow & Dehgan 1988; Meerow *et al.* 2002).

La exina dimórfica en el grano de polen representa un carácter ancestral en *Hymenocallis*, así como el polen binucleado al momento de su liberación, y los estomas en las anteras; lo mismo ocurre con algunos otros caracteres relacionados con la megasporogénesis y el desarrollo seminal (Raymúndez *et al.* 2008). Por el contrario, el polen de gran tamaño, junto a otros caracteres reproductivos como las flores sésiles y erectas, representan una condición derivada en la evolución del grupo (Meerow *et al.* 2002).

Los caracteres embriológicos han sido de utilidad en la diagnosis de grupos de alto rango taxonómico (Furness & Rudall 1999; Furness *et al.* 2002). Aquéllos que tipifican el patrón de desarrollo embriológico suelen conservarse dentro de estas altas jerarquías, cambiando únicamente en los detalles característicos de cada grupo de menor rango; por ello, el presente trabajo contribuye a ampliar el conocimiento sobre las particularidades en el desarrollo de la microsporogénesis en un miembro de la familia Amaryllidaceae y caracteriza por primera vez el desarrollo embriológico de una especie del género *Hymenocallis* con detalles específicos.

AGRADECIMIENTOS

Al Postgrado en Botánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela; al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico y al

Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, por el financiamiento del presente proyecto. Apreciamos de manera especial la asistencia técnica de H.P. Pérez de Vlarar. Nuestro agradecimiento también a los árbitros que evaluaron el artículo, por sus aportes, sugerencias y excelentes comentarios para mejorar la versión final de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Brewbaker, J.L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *Amer. J. Bot.* 54: 1069-1083.
- Dahlgren, R.M.T., H.T. Clifford & P.F. Yeo. 1985. *The families of monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg.
- Davis, G.L. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley & Sons. New York.
- Dutt, B.S.M. 1964. Ovule and embryo sac of *Pancratium maritimum* L., a reinvestigation. *Curr. Sci.* 33: 150-151.
- Dutt, B.S.M. 1970. Amaryllidaceae L. Symposium on comparative embryology of angiosperms. *Bull. Indian Nat. Sci. Acad.* 41: 365-367.
- Furness, C.A. & P.J. Rudall. 1998. The tapetum in monocotyledons: structure and systematics. *Bot. Rev.* 64: 201-239.
- Furness, C.A. & P.J. Rudall. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Ann. Bot.* 84: 475-499.
- Furness, C.A., P.J. Rudall & B.F. Sampson. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *Int. J. Pl. Sci.* 163: 235-260.
- Hesse, M. 1981. The fine structure of the exine in relation to the stickiness of angiosperm pollen. *Rev. Paleobot. Palynol.* 185: 81-92.
- Howell, G. & N. Prakash. 1990. Embryology and reproductive ecology of the Darling Lily, *Crinum flaccidum* Herbert. *Austral. J. Bot.* 38: 433-444.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company. New York-London.
- Knox, R.B. 1984. The pollen grain. In: *Embryology of Angiosperms* (Johri, B.M., ed.), pp. 197-271. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg.
- Meerow, A. & B. Dehgan. 1985. The auriculate pollen grain of *Hymenocallis quitensis* Herb. (Amaryllidaceae) and its systematic implications. *Amer. J. Bot.* 72: 540-547.
- Meerow, A. & B. Dehgan. 1988. Pollen morphology of the Eucharideae (Amaryllidaceae). *Amer. J. Bot.* 75: 1857-1870.
- Meerow, A.W., C.L. Guy, Q.-B. Li & J.R. Clayton. 2002. Phylogeny of the tribe Hymenocallideae (Amaryllidaceae) based on morphology and molecular characters. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 89: 400-413.
- Ravikumar, C. & P.K.K. Nair. 1982. Pollen morphological analysis of *Hymeno-*

- callis littoralis* Salisb. and *H. pedalis*, SEM and light microscopic study. *J. Palynol.* 18: 43-54.
- Raymúndez, M.B. 1997. Estudios citogenéticos, embriológicos y morfoanatómicos en especies venezolanas del género *Hymenocallis* Salisb. (Amaryllidaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Raymúndez, M.B., M. Escala J. & N. Xena de Enrech. 2008. Megasporogénesis en *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. (Amaryllidaceae) y algunas características de su desarrollo seminal. *Acta Bot. Venez.* 31(2): 435-460.
- Roubik, D.W. & J.E. Moreno. 1991. *Pollen and spores of Barro Colorado Island*. Monographs in Systematic Botany, vol. 36. Missouri Botanical Garden. St. Louis, Missouri.
- Sánchez, C. 1995. *Guías de Laboratorio del Curso: Microtecnia Vegetal*. Postgrado en Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. Mimeografiado.
- Stenar, H. 1951. Zur die Embryologie von *Haemanthus cathaerine* Bak., nebst Erörterungen über das helobiale Endosperm in den Amaryllidaceae und Liliaceae. *Acta Horti Bergiani* 16: 57-72.