

# MORFOANATOMÍA DE LAS FLORES SUBTERRÁNEAS Y ALGUNOS ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE DOS ESPECIES ANFICÁRPICAS DE *Centrosema* (DC.) BENTH. (FABACEAE)

*Damelis Jáuregui y Yannely Aponte*

Laboratorio de Morfoanatomía Vegetal, Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de  
Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua.  
jaureguid@gmail.com

## COMPENDIO

La anficarpía es un fenómeno que ocurre en algunas especies, el cual consiste en la producción de frutos aéreos y subterráneos en la misma planta, siendo ventajoso para ellas, ya que asegura su persistencia ante condiciones desfavorables. Esta investigación tiene como objetivos: caracterizar y comparar la morfoanatomía de las flores subterráneas de dos especies anficárpicas, *C. rotundifolium* Mart. ex Benth. y *C. venosum* Mart. ex Benth., e inferir algunos aspectos de su biología reproductiva. Para caracterizar morfoanatómicamente cada uno de los verticilos florales se recolectaron flores y se procesaron sus piezas siguiendo la metodología clásica para su estudio con microscopio óptico y electrónico de barrido. Se calculó la asignación de recursos a las partes fértiles y estériles y también las relaciones polen/óvulo por flor y semilla/óvulo por flor. Se concluyó que existen similitudes en el tamaño y en la morfoanatomía de sus piezas. Las flores son cleistógamas, con diferencias claras entre ellas y las aéreas. El androceo es monadelfo, presenta estambres fértiles y estériles con anteras morfológicamente diferentes. El nectario es vestigial. El estigma es papiloso, bordeado por tricomas periestigmáticos, y cubierto por una membrana. La asignación de biomasa es dirigida principalmente al perianto seguido de los verticilos reproductivos. La eficiencia en producción de semillas es del 100%.

## PALABRAS CLAVE

Anficarpía, *Centrosema*, estructura floral, flores subterráneas.

**MORPHOANATOMY OF UNDERGROUND FLOWERS AND SOME REPRODUCTIVE ASPECTS OF TWO AMPHICARPIC SPECIES OF *Centrosema* (DC.) BENTH. (FABACEAE)**

**ABSTRACT**

Amphicarpia is a phenomenon that occurs in some species, which consists in the production of both aerial and underground fruits in the same plant, being advantageous for them, since it ensures their persistence under unfavorable conditions. This research aims to characterize the morphoanatomy of the underground flowers of two amphicarpic species, *C. rotundifolium* Mart. ex Benth. and *C. venosum* Mart. ex Benth. and infer some aspects of his reproductive biology. In order to morphoanatomically characterize each one of the floral whorls, flowers were collected and their whorls were processed following the classical methodology for their study with an optical and scanning electron microscope. It was calculated the allocation of resources to the fertile and sterile parts and also the pollen/ovule and seed/ovule ratios. It was concluded that there are similarities in the size and morphoanatomy of their pieces. The flowers are cleistogamous, with clear differences between them and the aerals. In this case, the stamens are monadelphous with anthers fertile and sterile, morphologically different. The nectary is vestigial. The stigma is papillous, it is bordered by peristigmatic trichomes and covered by a membrane. The biomass allocation is mainly directed to the perianth followed by the reproductive whorls. The efficiency in seed production is 100%.

**KEY WORDS**

Amphicarpia, *Centrosema*, floral structure, underground flowers.

**INTRODUCCIÓN**

La anficarpía es una forma especial de dimorfismo, donde la planta es capaz de producir frutos tanto aéreos como subterráneos, y por ende semillas (Cheplick 1987, Zhang *et al.* 2020). Los frutos subterráneos son producidos sobre vástagos subterráneos (Kaul *et al.* 2000). Este dimorfismo es conocido desde 1601 por botánicos y ecólogos, siendo filogenéticamente joven y muy variable (Cheplick 1987). La anficarpía no debe confundirse con geocarpía, ya que en este último caso las flores aéreas, luego que ocurre la polinización, pierden sus pétalos y se

encorvan hasta penetrar la superficie del suelo, donde los frutos y las semillas maduran subterráneamente (Kaul *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2020). La anficarpía es una forma de garantizar un banco de semillas en el suelo de las especies que tienen este fenómeno, que no se verá afectado o lo será en menor proporción, por las variaciones climáticas ambientales; se ha señalado que funciona como yemas vegetativas latentes de plantas perennes, ya que los frutos subterráneos se mantienen próximos a la planta madre (Zhang *et al.* 2020).

Muchas de las plantas anficárpicas son anuales y solo unas pocas son perennes (Kaul *et al.* 2000). Dentro de las leguminosas existen varias especies anficárpicas, pudiendo citar a: *Macroptilium fraternum* Juárez y S. Pérez (Drewes y Hoc 2000), *Trifolium polymorphum* Poir. (Speroni e Izaguirre 2001, 2003), *Flemingia pauciflora* Benth., *Glycine falcata* Benth. y *Vigna lanceolata* Benth. (Saravana-Kumar *et al.* 2012 y Lawn y Bielg 2016), entre otras; también se señalan cuatro especies de *Centrosema*: *C. bracteosum* Benth., *C. grazielae* Barbosa, *C. rotundifolium* Mart. ex Benth. y *C. venosum* Mart. ex Benth. (Clements 1990, Schmidt *et al.* 1996, Nikolic *et al.* 2005).

*Centrosema* es considerado uno de los tres géneros más importantes de leguminosas forrajeras tropicales (Schultze-Kraft y Clements 1995), además de *Stylosanthes* Sw. y *Desmodium* Desv. (Schultze-Kraft 2000). La presencia de anficarpía en algunas de sus especies puede representar una ventaja adaptativa ante diferentes condiciones ambientales incluyendo herbivoría, sequía, fuego, depredación de semillas, entre otras (Cheplick 1987, Cocks 1999, Kaul *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2020).

*C. rotundifolium* es un taxón introducido en Venezuela, con uso potencial como pasto y para la conservación del suelo en sabanas arenosas de los trópicos, ya que ha demostrado ser una leguminosa moderadamente productiva con gran adaptación a suelos arenosos, ácidos y de baja fertilidad (Müller y Schultze-Kraft 2000). Mientras que *C. venosum* es una especie nativa del país; sin embargo, no se halla dentro de los planes de investigación, ya que no ha sido posible cultivarla en condiciones artificiales de invernadero o de vivero, por lo que la multiplicación de germoplasma, y por tanto su conservación, son problemas no resueltos todavía (Schultze-Kraft *et al.* 1997). De estas especies, hay poca información de su biología floral, pudiendo destacar las descripciones morfológicas de las flores (Barbosa-Fevereiro 1977) y la caracterización morfoanatómica de las estructuras reproductivas de *C. rotundifolium* realizada por Saravana-Kumar *et al.* (2012). Recientemente, se publicó la caracterización morfoanatómica de las flores aéreas de estos taxones (Aponte y Jáuregui 2019).

La biología floral es un componente importante de la biología reproductiva de las plantas, debido a que investiga las relaciones mutuas entre las flores y su ambiente, biótico y abiótico, con respecto a la polinización, fertilización, formación de frutos y semillas (Mansilla *et al.*, 2010). Su conocimiento y el del sistema reproductivo de las plantas son fundamentales para su manejo y para la implementación de actividades de mejoramiento (Corredor y García 2011).

Este trabajo aporta información sobre la morfoanatomía de las flores subterráneas y algunos aspectos de la biología reproductiva de dos leguminosas anficárpicas, *Centrosema rotundifolium* Mart. ex Benth. y *C. venosum* Mart. ex Benth.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL Y SIEMBRA

Para el estudio de *C. venosum* se recolectaron flores, frutos y semillas en el Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Anzoátegui (CIAE) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), en la localidad de El Tigre, a 625 msnm. Mientras que *C. rotundifolium* se cultivó en Maracay, estado Aragua a objeto de obtener el material necesario para realizar este estudio. Para ello se recolectaron semillas de plantas establecidas en el centro de investigaciones antes citado, las cuales procedían de distintas accesiones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) identificadas como: CIAT 5260, 5283, 5521, 5721, 25120 y 25148.

### MORFOLOGÍA FLORAL

Para el estudio morfológico se recolectaron 30 flores subterráneas en cada especie; las mismas fueron fijadas en una solución de FAA (formaldehído, ácido acético glacial y etanol 70%). Se determinaron las dimensiones de las piezas del perianto, partes del androceo y del gineceo, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y utilizando una micro-regla milimetrada. Con el fin de estimar el área estigmática se recolectaron los estigmas de 10 flores frescas de cada taxón. Estos fueron observados y dibujados en cámara lúcida (tomando en cuenta el aumento del equipo). La porción dibujada fue recortada y llevada a un planímetro electrónico digital (CID, Inc. Modelo: Ci-202 Logitech), lo cual permitió medir el área estigmática (Berzonsky *et al.* 1986).

### ANATOMÍA FLORAL

Para la caracterización anatómica de cada uno de los verticilos florales, se recolectaron cinco flores por especie. Estas muestras fueron separadas en sus

partes constituyentes y fijadas en FAA por un período mínimo de 48 horas. Posteriormente, se deshidrataron en una serie creciente de alcohol butílico terciario, para luego incluir las muestras en parafina con punto de fusión comprendido entre 56-58 °C. Los bloques obtenidos se seccionaron en un micrótopo de rotación, a un espesor  $\pm 6 \mu\text{m}$ . Se realizaron secciones transversales y/o longitudinales. Los cortes obtenidos se colocaron en láminas portaobjetos y se tiñeron con safranina-fast green, desparafinando previamente (Johansen 1940) y/o con azul de toluidina acuosa (0,5%) sin desparafinar (Sakai 1973). Se utilizó como medio de montaje bálsamo de Canadá, obteniendo así láminas permanentes, las cuales fueron estudiadas con un microscopio óptico marca Nikon E-200 y se tomaron fotografías de los distintos tejidos y/o estructuras con una cámara digital marca Evolution LC adaptada al microscopio.

#### MICROMORFOLOGÍA DEL ESTANDARTE Y DEL ESTIGMA

Se estudió en cinco flores por especie. Las piezas florales indicadas se deshidrataron en una serie creciente de alcohol etílico; luego se colocaron en acetona, se secaron por punto crítico y se metalizaron con oro-paladio, siguiendo el protocolo de Drewes (2005). El material fue observado en el microscopio electrónico de barrido (MEB) modelo Phenom, en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía (CenMEFA), de la Universidad Central de Venezuela.

#### ESTIMACIÓN DE ALGUNAS VARIABLES INVOLUCRADAS EN LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

1) Asignación de recursos: se determinó el peso seco de cáliz, corola, androceo y gineceo. Para ello se tomaron 30 flores, provenientes de diferentes individuos, las cuales se separaron en: cáliz, corola, estambres y gineceo; estas piezas fueron colocadas en papel de aluminio previamente identificado y enumerado, y secadas a 60 °C hasta peso constante por un mínimo de 10 días, utilizando una balanza analítica digital Marca Kern modelo ALj 220-4M. La biomasa reproductiva floral estuvo representada por el peso seco promedio del gineceo y del androceo; y la biomasa vegetativa por el peso seco promedio del cáliz y de la corola. Posteriormente, se determinaron las relaciones de biomasa sexual/biomasa vegetativa, biomasa femenina/biomasa masculina, biomasa masculina/biomasa femenina y biomasa de atracción/biomasa reproductiva. Estas relaciones de biomasa son consideradas como una medida relativa de la inversión que realiza una planta en estructuras para la reproducción (Ramírez 1992).

2) Relación polen/óvulo (P/O): se determinó siguiendo la metodología descrita por Cruden (1977). Se estimó el número de granos de polen por flor y se contó el número de óvulos por flor en 30 pistilos provenientes de las flores subterráneas de las dos especies. El número de granos de polen por antera se estimó en una suspensión de 5 hasta 20 anteras fértiles, cerradas. Las anteras provenían de flores de individuos diferentes (una antera/flor/planta) y las mismas fueron colocadas en una piedra de toque y se les agregó una gota de una solución acetolítica (una parte de ácido sulfúrico en nueve partes de acético anhidro). Esta se dejó secar por varias horas y en el caso de que las anteras no abrieran por sí mismas, se trituraron bajo la lupa con la ayuda de una varilla de vidrio chequeando que todos o casi todos los granos de polen se hubiesen liberado. Posteriormente, se adicionó 0,1 ml de azul de anilina en lactofenol (1%). Luego con la ayuda de una pipeta Pasteur, la solución se mezcló durante 30 segundos y se transfirió una gota de la misma a cada una de las cámaras de Neubauer (dos observaciones por placa). Los conteos se realizaron usando un microscopio óptico marca Leitz. Se repitió el procedimiento hasta obtener un total de 30 mediciones. En cada medición se contó el número total de granos de polen en los cuadrados de las esquinas y central de la cámara. Los treinta conteos se promediaron y se calculó el número de granos presentes por antera. El número de granos de polen por flor se obtuvo multiplicando el número de granos de polen por antera por el número promedio de anteras por flor. El número de óvulos por flor se contó en 30 pistilos provenientes de las flores de individuos diferentes de las cinco especies, previamente preservadas en FAA. Finalmente, se determinó la relación polen/óvulo dividiendo el número promedio de granos de polen/flor entre el número promedio de óvulos/ovario (Lloyd 1965).

3) Relación semilla/óvulo: para calcular el número promedio de semillas por fruto se realizó un conteo directo de las semillas presentes en 30 frutos (recolectados de varios individuos) para cada especie. La relación semilla/óvulo es el cociente entre el número de semillas por fruto y el número de óvulos por flor, correspondiendo este valor a los óvulos que se transforman en semillas (Ramírez 1992).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon los estadísticos descriptivos: media, desviación estándar y coeficiente de variación para la mayoría de las variables consideradas en el presente estudio. Los resultados fueron procesados utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% y la prueba de comparaciones de medias de Tukey; para ello se utilizó el software Statistix 8.0 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las flores subterráneas de las especies estudiadas responden a las características típicas de las Papilionoideae: son perfectas y zigomorfas; pero son cleistógamas, producidas en racimos geotrópicamente positivos, insertos en tallos subterráneos (Jáuregui 2011, Saravana-Kumar *et al.* 2012) (Fig. 1A). Se ha indicado que las estructuras florales y por ende los frutos subterráneos pueden formarse de rizomas originados del nudo cotiledonar, como ocurre en *Flemingia pauciflora* Benth. y *Vigna lanceolata* Benth. o de tallos formados en el cuello de plantas, tal es el caso de *Glycine falcata* Benth. (Saravana-Kumar *et al.* 2012). Las flores de *C. rotundifolium* y *C. venosum* tienen mucha similitud y se caracterizan por ser pequeñas; generalmente son incoloras (Fig. 1B), pero en algunos casos cuando quedan expuestas muy cerca de la superficie del suelo se tornan de coloración violácea. Estas flores resultaron más pequeñas al compararlas con las aéreas de estas mismas especies (Aponte y Jáuregui 2019). El tamaño reducido de las flores subterráneas es un rasgo citado por Saravana-Kumar *et al.* (2012) al trabajar con cuatro Fabaceae anficárpicas, entre ellas *C. rotundifolium*. Asimismo, este carácter fue observado por Zhang *et al.* (2006) al comparar las flores aéreas y subterráneas de *Amphicarpaea edgeworthii* Benth., y por Lawn y Bielig (2016) al estudiar varios morfotipos e híbridos de *Vigna lanceolata* Benth. En *Flemingia pauciflora* Benth. se ha reportado el desarrollo de color cuando las flores se exponen a la luz antes de completar su desarrollo (Saravana-Kumar *et al.* 2012). En flores cleistógamas es obligada la autogamia, por lo que las mismas siempre son más pequeñas que las casmógamas (Rodríguez-Riaño 1999), ya que se reduce la traslocación de recursos hacia la partes accesorias y para la biosíntesis de pigmentos (Kaul *et al.* 2000).

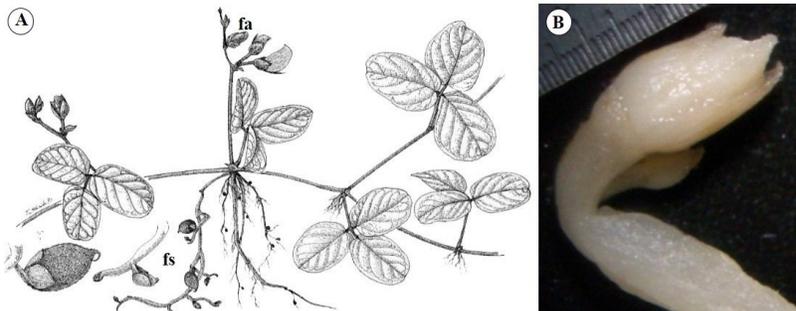


Fig. 1. *Centrosema rotundifolium*. A. Esquema general de una planta anficárpica, mostrando ubicación de flores subterráneas. B. Detalle de una flor subterránea. fa: flores aéreas, fs: flores subterráneas.

Tabla I. Valores promedio y desviación estándar de las variables morfológicas medidas en flores subterráneas de dos especies de *Centrosema*.

VARIABLES		<i>C. rotundifolium</i>	<i>C. venosum</i>
Cáliz	Largo	3,2±0,5	3,3±0,4
	Ancho	3,9±0,6	3,6±0,7
Corola	Estandarte	Largo	3,01±0,55
		Ancho	3,14±0,73
	Alas	Largo	2,54±0,53
		Ancho	0,94±0,13
	Quilla	Largo	2,36±0,64
		Ancho	1,19±0,44
Androceo	Filamento	Largo	1,9±0,4
	Antera	Largo	0,3±82x10 <sup>-3</sup>
		Ancho	0,3±0,1
Gineceo	Largo del pistilo		2,40±0,45
	Estigma	Ancho	0,46±51x10 <sup>-3</sup>
		Largo	1,48±0,39
	Estilo	Ancho	0,33±48x10 <sup>-3</sup>
		Largo	0,92±0,14
	Ovario	Ancho	0,7±94x10 <sup>-3</sup>
Largo		0,89±0,13	
Fruto	Ancho	0,63±0,15	
	Largo	1,13±0,08	

Mediciones expresadas en mm.

Cáliz: este verticilo es gamosépalo con tubo largo. No hubo diferencias significativas en cuanto a las dimensiones de esta pieza entre las especies bajo estudio (Tabla I). Sin embargo, la longitud del cáliz en *C. venosum* resultó ligeramente superior a la de *C. rotundifolium*, pero a su vez esta pieza es más angosta que en esa especie. La superficie abaxial en ambas especies es densamente pubescente. Este verticilo adopta la forma de capuchón y cubre casi en su totalidad al estandarte, lo cual le permitiría proteger a los verticilos internos más delicados durante su desarrollo en el suelo, tal como ha sido reportado por Speroni e Izaguirre (2001, 2003) para *Trifolium polymorphum* y por Savarana-Kumar *et al.* (2012) en otras tres Fabaceae. Los sépalos (Figs. 2A y 2B) tienen epidermis uniestratificada, la abaxial formada por células subglobosas a globosas en *C. rotundifolium* y cuadrangulares en *C. venosum*,

con contenido denso; es común en esta superficie la presencia de tricomas uncinados, bicelulares, lo cual constituye un rasgo adicional de protección, como ha sido indicado para Papilionoidae por Tucker (1987), y la adaxial con células rectangulares, de paredes y cutícula delgada. El mesofilo posee de cuatro a seis capas de células globosas, de paredes delgadas. Los haces vasculares son colaterales cerrados, con un grupo de células esclerenquimáticas próximas al floema. La anatomía de los sépalos es bastante similar a la observada en las flores aéreas de estas especies (Aponte y Jáuregui 2019).

Corola: se asemeja al tipo papilionáceo de las flores aéreas con estandarte, alas y quilla, pero con una reducción en sus dimensiones y pérdida evidente de la coloración como resultado de la adaptación a la vida subterránea. El estandarte es el pétalo más externo, con forma de capucha por lo que cubre casi en su totalidad el resto de los verticilos florales (Figs. 2C y 2D), a diferencia de lo observado en las flores aéreas de ambas especies (Aponte y Jáuregui 2019). No se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto a las dimensiones del estandarte, alas y quilla entre ambas especies. Sin embargo, *C. venosum* es de mayor tamaño que *C. rotundifolium* en casi todas las variables medidas, excepto en la longitud del estandarte (Tabla I). Estructuralmente este verticilo (Figs. 2E y 2F) se asemeja al cáliz. En ambas especies, la epidermis es uniestratificada; la abaxial con células cuadrangulares y cutícula gruesa (Fig. 2E), con tricomas uncinados, bicelulares, de menor longitud y en menor frecuencia que en el cáliz; la adaxial constituida por células rectangulares, de paredes y cutícula delgada, glabra. Subepidérmicamente, se presentan de cuatro a seis capas de células parenquimáticas, globosas, de paredes delgadas. Los haces vasculares son colaterales cerrados sin esclerenquima asociado. En las especies estudiadas no se observó reducción de las piezas de la corola, como ha sido señalado para otras especies anficárpicas, tales como *T. polymorphum* donde la corola tiene solo tres piezas (Speroni e Izagirre 2001). El arreglo estructural de estas piezas es semejante al referido para las flores aéreas de estas especies (Aponte y Jáuregui 2019). Es probable que ello esté relacionado con la función de protección que el perianto, en general, debe ofrecer a las partes reproductivas, debido a las condiciones ambientales que deben soportar.

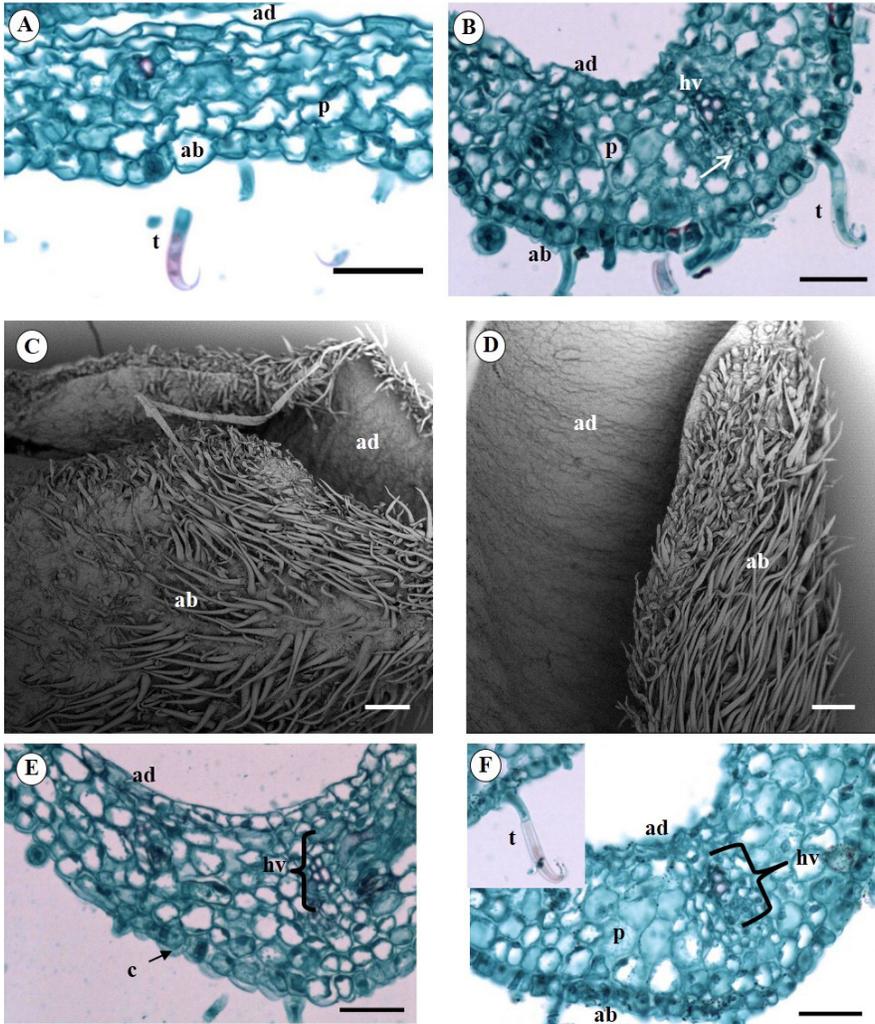


Fig. 2. Perianto en flores subterráneas de *Centrosema*. A, B, E, F. Fotomicrografías tomadas en el microscopio óptico. C. y D. Fotomicrografías tomadas en el microscopio electrónico de barrido. A. y B. *C. rotundifolium* y *C. venosum*, secciones transversales del cáliz; nótese tricomas uncinados en la epidermis abaxial, y células esclerenquimáticas asociadas al haz vascular hacia la cara abaxial, indicadas con flecha. C. y D. *C. rotundifolium* y *C. venosum*, estandarte; nótese superficie adaxial glabra y abaxial densamente pubescente y en forma de capuchón. E. y F. *C. rotundifolium* y *C. venosum*, sección transversal del estandarte; nótese grosor de la cutícula y tricomas en la epidermis abaxial. ab: epidermis abaxial, ad: epidermis adaxial, c: cutícula, hv: haz vascular, p: parénquima, t: tricoma. Barra: A, B, E, F = 30  $\mu\text{m}$ , C= 100  $\mu\text{m}$ , D = 75  $\mu\text{m}$ .

Androceo: en ambas especies está formado por diez estambres monadelfos, de los cuales cinco son fértiles y se alternan con estambres que han perdido su funcionalidad; estos últimos tienen una sola teca y adoptan forma de lanza (Fig. 3A); el tener una sola teca indica reducción en esta estructura como lo ha señalado Uphof (1938) en este tipo de flores. Aunque no hubo reducción en el número de estambres como se ha reportado (Uphof 1938, Speroni e Izaguirre 2001, 2003, Conterato *et al.* 2013). El tubo estaminal es inconspicuo, quedando prácticamente libres los filamentos, los cuales son glabros y se encuentran unidos formando un tubo muy reducido de 0,4 mm de longitud (Fig. 3A). No hubo diferencias significativas en cuanto a las dimensiones del tubo estaminal en ambas especies; sin embargo, los filamentos de *C. rotundifolium* son ligeramente de mayor longitud que los de *C. venosum*, siendo las anteras más reducidas en la primera especie (Tabla I). Las anteras fértiles son más o menos esféricas y tetrasporangiadas, y las infuncionales son bisporangiadas.

El androceo de estas flores muestra diferencias notorias con el de las flores aéreas de las mismas especies, no solo en tamaño, sino también en su morfología, ya que en las aéreas este verticilo es diadelfo con tubo estaminal relativamente largo y 10 estambres fértiles con anteras tetrasporangiadas (Aponte y Jáuregui 2019). En otras especies con anficarpía: *Flemingia pauciflora*, *Glycine falcata* y *Vigna lanceolata*, al igual que en *C. rotundifolium* se ha indicado que las anteras son más pequeñas que en las flores aéreas, pero con polen (Saravana-Kumar *et al.* 2012). El tubo estaminal (Fig. 3B) y los filamentos (Figs. 3C y 3D) presentan epidermis uniestratificada, con células rectangulares, organizadas anticlinalmente y paredes externas más cutícula ligeramente gruesas. Seguidamente, es evidente parénquima constituido por células de formas irregulares, de diferentes tamaños, de paredes delgadas, relativamente compacto. Hacia la zona central de lo que luego se individualiza como filamento o en estos ya separados, se presenta un haz conductor poco desarrollado, anficribal. La anatomía de la antera de las flores subterráneas es similar en las dos especies. La antera fértil (Figs. 3E y 3F) y la estéril (Figs. 3G y 3H) presentan un exotecio uniestratificado, formado por células cuadrangulares en sentido transversal y rectangulares longitudinalmente, con pared celular más cutícula delgada. El endotecio está formado por un estrato de células relativamente grandes, rectangulares, orientadas anticlinalmente con engrosamientos fibrosos; observaciones semejantes fueron hechas en *T. polymorphum* (Speroni e Izaguirre 2001) y son evidentes en la fotomicrografía de la sección transversal de una antera en *Vigna lanceolata* (Saravana-Kumar *et al.* 2012). Hacia el interior de la teca se observaron las capas medias y el

tapete o restos de él, cuyas células muestran fuerte tinción con el colorante. El conectivo presenta numerosas células en las proximidades de las tecas, con inclusiones que reaccionan con el colorante, tomando una coloración parda o rojiza (Fig. 3E); dichas inclusiones probablemente son compuestos fenólicos que evitan el ataque de los depredadores. Se ha indicado que las piezas florales aéreas de las leguminosas pueden tener estructuras secretoras que actúan como mecanismos de defensa ante herbívoros y patógenos, radiación UV o deshidratación; entre ellas se cita la ocurrencia de compuestos fenólicos en el filamento estaminal de *Mucuna urens* (L.) Medik. y *Platycyamus regnelli* Benth. (Cury de Barros *et al.* 2016). Dentro de las tecas de los estambres fértiles se localizan abundantes granos de polen, mientras que en las anteras no fértiles se observaron pocos. En las flores aéreas de las especies anficárpicas estudiadas, las anteras son todas tetrasporangiadas y fértiles, a diferencia de las subterráneas, que como se dijo antes, tienen cinco estériles, bisporangiadas y con forma de lanza. Al ser flores autógamas requieren menor cantidad de polen para que ocurra la fertilización, y una estrategia de la planta para asegurar recursos es evitar la funcionalidad de un número importante de anteras.

Además, es posible que la polinización en estas flores sea del tipo casmoantérica, por lo que el polen llegaría al estigma luego de la apertura normal de los sacos polínicos de la antera, ya que se evidenció una estructura relativamente normal en las capas externas de la misma. Sin embargo, no se descarta que el exotecio y endotecio hayan perdido su funcionalidad para la apertura de la antera, tal como ha sido reportado por Speroni e Izaguirre (2001, 2003) en *T. polymorphum*, al detectar polinización cleistoantérica, es decir, que los tubos polínicos atravesaron la pared de la antera hacia el estigma de la propia flor. En las flores de las dos especies estudiadas se observó que al menos dos anteras se desarrollan logrando un íntimo contacto entre anteras y estigma (Fig. 3I), lo cual facilitaría este último tipo de polinización.

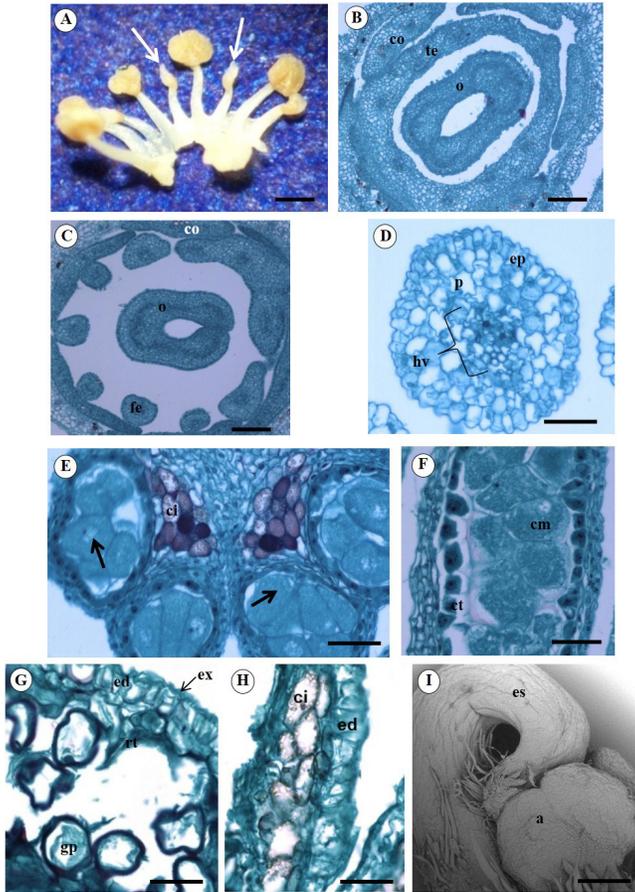


Fig. 3. Androceo de flores subterráneas de *Centrosema*. A-H. Fotomicrografías tomadas en el microscopio óptico. I. Fotomicrografía tomada en el microscopio electrónico de barrido. A. *C. rotundifolium*, vista general del tubo estaminal con estambres no funcionales (indicados con flechas) alternos con los fértiles. B. *C. rotundifolium*, en transcorte; nótese el tubo estaminal. C. *C. venosum*, vista general de los filamentos. D. *C. venosum*, detalle del filamento; mostrando haz vascular. E. *C. venosum*, detalle de la antera; obsérvense células del conectivo con inclusiones y células madres de las microsporas (indicadas con flechas). F. *C. venosum*, detalle de un saco polínico inmaduro; nótese células del tapete rodeando las células madres de las microsporas. G. *C. rotundifolium*, detalle de antera madura mostrando granos de polen y restos del tapete. H. *C. rotundifolium*, antera estéril en sección longitudinal; mostrando endotecio y células con inclusiones. I. *C. rotundifolium*, nótese la proximidad antera-estigma. a: antera, ci: células con inclusiones, cm: células madres, co: corola, ct: células del tapete, ed: endotecio, ep: epidermis, es: estilo, ex: exotecio, fe: filamento estaminal, gp: grano de polen, hv: haz vascular, o: ovario, p: parénquima, rt: restos del tapete, te: tubo estaminal. Barra: A = 5 mm, B, C, I = 100  $\mu$ m, D-H = 30  $\mu$ m.

Nectario: las flores subterráneas de las dos especies estudiadas poseen un disco nectarífero que se encuentra rodeando la base del ovario y mide ca. 0,4 mm de altura. Este es del tipo estructural, pero carece de vascularización. La epidermis es uniestratificada con células de pared más cutícula ligeramente engrosadas. Seguidamente, se encuentran células globosas alargadas en sentido longitudinal, de contenido citoplasmático denso con núcleo notorio y pocos espacios intercelulares; a medida que estas se aproximan al ápice reducen su tamaño (Figs. 4A y 4B). No se observaron estomas ni tricomas en el nectario. De acuerdo a su grado de desarrollo y funcionalidad se le puede clasificar como vestigial y no secretor, a diferencia del visto en flores aéreas que es estructurado, liso o lobulado y vascularizado (Aponte y Jáuregui 2019). Este resultado es lógico, ya que en la autogamia obligada de las flores subterráneas, no es necesario que la planta invierta recursos en la producción de estructuras liberadoras de una recompensa tan importante, como lo es el néctar.

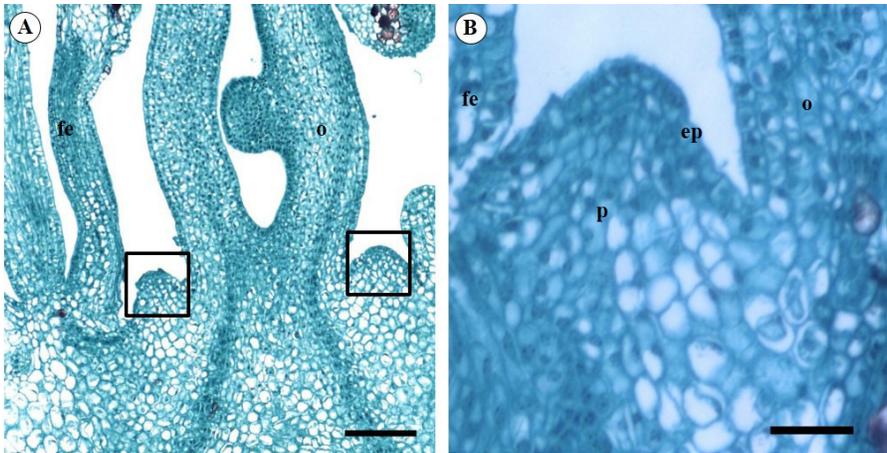


Fig. 4. Estructura anatómica del nectario en *Centrosema venosum*. A. Vista longitudinal de flor; nótese nectario (enmarcado con recuadros) entre androceo y gineceo. B. Detalle del mismo. ep: epidermis, fe: filamento estaminal, o: ovario, p: parénquima. Barra: A = 100  $\mu$ m, B = 30  $\mu$ m.

Gineceo: la longitud del pistilo no varió significativamente entre las especies. Sin embargo, la longitud en *C. venosum* es superior a la de *C. rotundifolium* (Tabla I). Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en cuanto al ancho del estigma de ambas especies, aunque en *C. venosum* tiende a ser ligeramente más ancho que en *C. rotundifolium* (Tabla I). La ubicación espacial del estigma dentro de la flor es muy particular (Fig. 3I), debido a la curvatura que toma el estilo. En las especies estudiadas el estigma es lineal, lo que se ha señalado para otras leguminosas (Gunn y Klive 1976). En ambas especies la superficie estigmática está cubierta en

su totalidad por papilas (Figs. 5A y 5B), con contenido bastante denso (Fig. 5C) y alrededor de esta se localizan tricomas con cutícula ornamentada (Figs. 5A y 5B), los cuales surgen en el extremo distal del estilo, por lo que se consideran periestigmáticos.

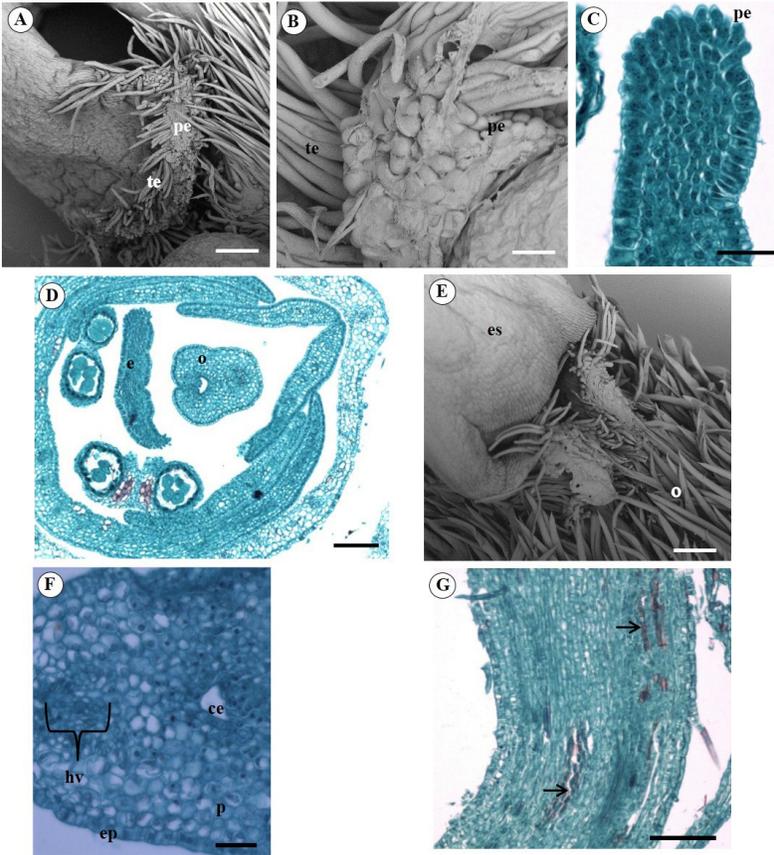


Fig. 5. Estructura anatómica del gineceo de flores subterráneas de *Centrosema*. A, B y E. Fotomicrografías bajo el MEB. C, D, F y G. Fotomicrografías bajo el microscopio óptico. A. *C. venosum*; nótese papilas estigmáticas y tricomas periestigmáticos. B. *C. venosum*, detalle del exudado estigmático que cubre las papilas estigmáticas. C. *C. venosum*, estigma; nótese papilas con contenido denso. D. *C. venosum*, flores en sección transversal; nótese estigma. E. *C. rotundifolium*, estilo visto desde la parte superior de la flor. F. *C. venosum*, estilo en transcurso. G. *C. rotundifolium*, estilo en sección longitudinal; nótese estructuras secretoras, indicadas con flechas. ce: canal estilar; e: estigma, ep: epidermis, es: estilo, hv: haz vascular, o: ovario, p: parénquima, pe: papilas estigmáticas, te: tricomas estilares. Barra: A y E = 75  $\mu$ m, B = 25  $\mu$ m, C, D, F = 30  $\mu$ m, G = 100  $\mu$ m.

Seguidamente debajo de la zona papilosa se localizan de 14-16 capas de células parenquimáticas redondeadas, de contenido denso y con paredes relativamente gruesas (Fig. 5D). El estilo es curvado (Figs. 3I y 5E) y completamente glabro, excepto en su porción terminal, donde se localizan tricomas alrededor del estigma (Figs. 5A y 5B); se considera tipo ciliado, debido a que los tricomas del ovario sobrepasan la base del mismo. Anatómicamente es bastante similar al de otras Leguminosae (Ghosh y Shivanna 1982), no mostrando características especiales; presenta una epidermis uniestratificada, con células cuadrangulares tanto en sección transversal como en longitudinal, de paredes relativamente gruesas (Figs. 5F y 5G). Luego de la epidermis se diferencia parénquima, formado por células globosas, de paredes delgadas en sección transversal y alargadas en vista longitudinal. El estilo es hueco como ha sido referido para las flores aéreas de estas especies (Aponte y Jáuregui 2019) y otros miembros de las Papilionoideae (Heslop-Harrison y Shivanna 1977, Ghosh y Shivanna 1982). En su parte central se encuentra el canal estilar; las células adyacentes al canal son redondeadas, con paredes más gruesas que las del parénquima cortical y contenido bastante denso. En las células del parénquima se observan gránulos de almidón, además de otras inclusiones, probablemente fenólicas. A un lado del canal estilar hay un haz vascular anficribal. El ovario es corto y ancho, existiendo diferencias significativas con relación a la anchura del mismo entre *C. rotundifolium* y *C. venosum* (Tabla I). El carpelo posee epidermis externa e interna uniestratificadas, con células cuadrangulares, de contenido bastante denso y pared celular más cutícula levemente engrosada (Figs. 6A y 6B). En la epidermis externa se distinguen tricomas glandulares, pequeños y tricomas tectores, bicelulares, largos con ápice agudo; estos apéndices posiblemente suministran protección al ovario fecundado durante su desarrollo. El mesofilo del carpelo está constituido por una matriz de células potencialmente meristemáticas con núcleo prominente. Asimismo, se localizan algunas células de mayor tamaño que el resto, con inclusiones. En ambas especies se presentan uno o dos óvulos en el interior del ovario, los cuales se desarrollan, generalmente, de forma exitosa como semillas. Saravana-Kumar *et al.* (2012) señalaron que en las flores subterráneas de las especies anficárpicas que ellos estudiaron, incluida *C. rotundifolium*, se forma un solo óvulo, y ocasionalmente dos. Los rudimentos seminales son bitegmentados (Fig. 6C). El gineceo de las flores anficárpicas se distingue del de las aéreas (Aponte y Jáuregui 2019) por la ausencia de cepillo polínico y por la presencia de ovarios más cortos, y con menor número de óvulos. La presencia de posibles compuestos fenólicos en esta porción de la flor puede vincularse con protección, como en el caso de las piezas del androceo, ya discutidas.

Los frutos de estas especies son blanquecinos (Figs. 7A y 7B), siendo los de *C. rotundifolium* ligeramente más anchos y más cortos que los de *C. venosum* (Tabla I). Cuando el fruto contiene una sola semilla, estas son de forma globosa en *C. rotundifolium* y ligeramente aplanadas en *C. venosum*, pero cuando tiene dos semillas, son aplanadas en la zona de contacto (Fig. 7C). Las semillas son de color marrón cuando están maduras (Fig. 7D). En ambas especies el número de semillas es menor que en las flores aéreas de las mismas especies (Aponte y Jáuregui 2019).

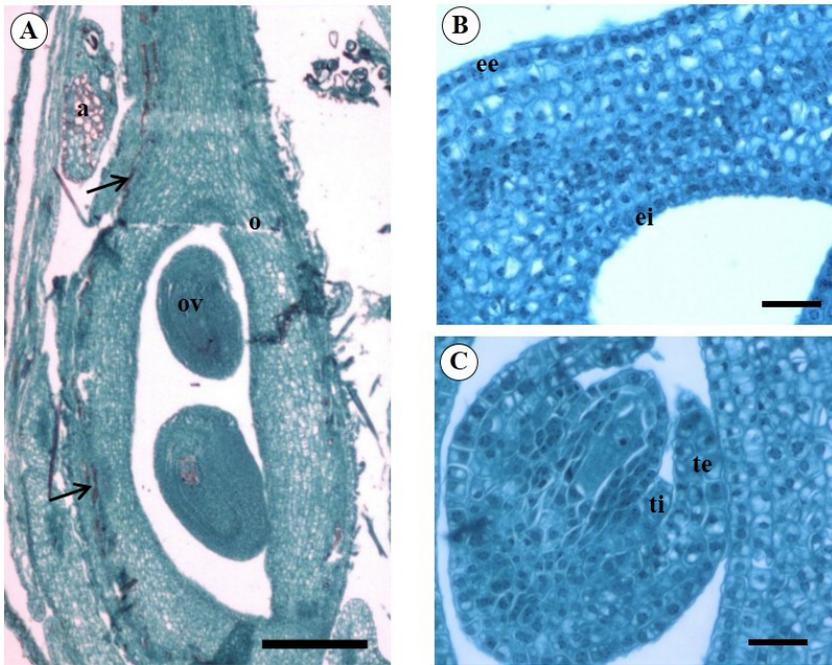


Fig. 6. A. *C. rotundifolium*, vista general del ovario en sección longitudinal; nótese indumento escaso, dos óvulos y estructuras secretoras (indicadas con flechas). B y C. *C. venosum*, vista de una porción del carpelo en sección transversal y detalle del óvulo, respectivamente. a: antera, ee: epidermis externa, ei: epidermis interna, o: ovario, ov: óvulo, te: tegumento externo, ti: tegumento interno. Barra: A = 100  $\mu$ m, B, C = 30  $\mu$ m.

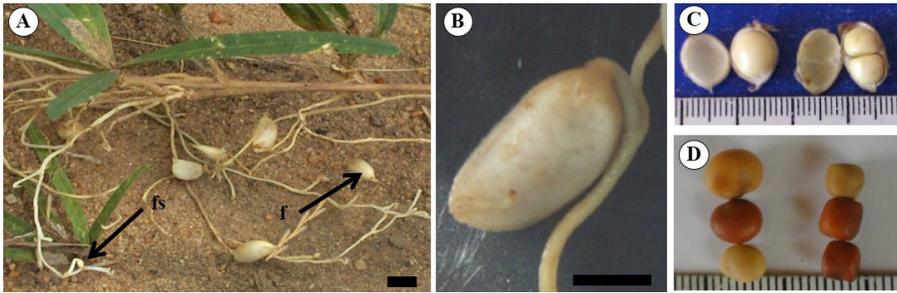


Fig. 7. Frutos y semillas provenientes de flores subterráneas. A. *C. venosum*, vista general de flores y frutos subterráneos. B. *C. venosum*, detalle de un fruto subterráneo inmaduro. C. *C. rotundifolium*, detalle de un fruto subterráneo inmaduro mostrando la(s) semilla(s) en su interior. D. *C. rotundifolium*, semillas maduras; a la izquierda provenientes de frutos con una sola semilla, nótese forma globosa, y a la derecha procedentes de frutos con dos semillas, obsérvese zonas aplanadas. f: fruto subterráneo, fs: flor subterránea.

## ASIGNACIÓN DE RECURSOS

La asignación de biomasa floral a cada verticilo y el peso total de las flores se señalan en los Tabla II. Los resultados muestran que en ambas especies hubo mayor asignación de biomasa a la corola, cáliz y gineceo, y que la asignación de recursos fue menor para el androceo; no obstante, estas diferencias en los pesos secos promedios no fueron significativas. Las relaciones de biomasa entre las funciones florales de *C. rotundifolium* muestran mayor asignación a la función femenina con respecto a la masculina, mientras que en *C. venosum* la inversión es mayor para la función masculina. En ambas especies se observó una alta inversión en estructuras vegetativas de protección (Tabla II).

La inversión en estructuras florales para atraer polinizadores es menor en plantas hermafroditas que frecuentemente se autofertilizan comparado con aquellas especies que regularmente se entrecruzan (Charlesworth y Charlesworth 1987, Lloyd 1987).

En las flores subterráneas de las especies anficárpicas bajo estudio existe una alta relación de biomasa reproductiva/biomasa vegetativa. La asignación de biomasa a las estructuras vegetativas de atracción está relacionada estrictamente con la función protectora de los verticilos fértiles. Por otra parte, la baja relación de biomasa masculina/femenina observada en *C. rotundifolium* indica que la seguridad de la polinización reduce la inversión en estructuras masculinas, mientras que en *C. venosum* ocurrió lo contrario, la asignación de biomasa hacia las estructuras masculinas con respecto a las femeninas fue

mayor, es decir, hubo más gasto energético en estructuras masculinas pre-fertilización. Sin embargo, la asignación es menor que en las flores aéreas (Aponte y Jauregui 2019). Es posible que estas especies difieran en el tiempo de desarrollo de la anficarpía, y por ello muestren diferente comportamiento; poco se sabe de la evolución de este fenómeno, pero en general se ha indicado que la cleistogamia es favorecida bajo condiciones de desarrollo pobre, y aparentemente la cleistogamia dimórfica es producida gradualmente y tiene una base genética, pero es afectada por factores bióticos y abióticos (Gopinathan y Babu 1987, Culley y Klooster 2007). Cabe destacar que la presencia de estomas y tricomas en los tallos subterráneos portadores de las flores subterráneas en *C. venosum* (Jáuregui 2011), puede ser evidencia de que los mismos derivaron recientemente de estructuras caulinarias aéreas. A este respecto, Raunkier (1934 citado por Appezzato da Glória 2003) señaló que los sistemas subterráneos derivan gradualmente de sistemas aéreos con la finalidad de proteger y esconder las yemas para que una planta pueda sobrevivir ante condiciones desfavorables.

#### PRODUCCIÓN DE ÓVULOS, POLEN Y RELACIÓN P/O

El promedio de granos de polen producido por las flores subterráneas presentó diferencias estadísticas significativas entre las especies. *C. venosum* produjo más granos de polen que *C. rotundifolium* (Tabla II). Contrariamente, no se encontraron diferencias significativas en el número promedio de óvulos/flor en las especies bajo estudio (Tabla II). La relación P/O fue mayor en *C. venosum*.

La relación polen/óvulo es un parámetro que predice el tipo de sistema reproductivo de un taxón (Cruden 1977), mediante la relación entre la producción de polen y la de óvulos por flor. Este valor refleja la eficiencia de la flor en la transferencia de polen y es más bajo cuanto más eficaz es esta. Las flores cleistógamas subterráneas analizadas producen pocos granos de polen con respecto a las flores casmógamas-aéreas (Aponte y Jauregui 2019). El cociente polen/óvulo encontrado en las flores subterráneas de *C. rotundifolium* las incluye dentro del grupo de plantas cuyo sistema reproductivo es la autogamia obligada, mientras que en *C. venosum* dicha relación corresponde a autogamia facultativa; es decir, que no siempre los datos obtenidos en esta relación coinciden con los reportados por Cruden (1977) en lo que respecta al sistema reproductivo. Rodríguez-Riaño *et al.* (1999) señalaron que en especies de *Lupinus* L. la relación P/O las catalogaría como xenógamas, lo cual se aleja de la realidad pues la mayoría se autopoliniza con éxito. Asimismo, señalaron que en *Lathyrus* y *Pisum* este cociente indica que se

comportan como xenógamas; sin embargo, son autocompatibles con mecanismos que promueven la fertilización cruzada. Los valores obtenidos de la relación P/O en las especies bajo estudio, al igual que el calculado de datos obtenidos por Speroni e Izaguirre (2003) en flores subterráneas de *T. polymorphum* (196) y los contabilizados por Conterato *et al.* (2013), en *T. argentinense* (429) también en este tipo de flores, son superiores al reportado para el grupo de plantas con flores cleistógamas por Cruden (1977), el cual fue de 4,7. En estas flores debe ocurrir una autopolinización y autofecundación estricta y obligada, por lo que el valor de la relación P/O debiese ser más bajo, aproximándose al propuesto por Cruden (1977); es probable que el desarrollo de las flores subterráneas en estas especies sea reciente y por ello no se hayan consolidado rasgos propios de cleistógamas.

Tabla II. Valores promedio de algunas variables relacionadas con la reproducción sexual en flores subterráneas de dos especies de *Centrosema*.

	Variabes	<i>C. rotundifolium</i>	<i>C. venosum</i>
Biomasa seca (mg)	Flor	2,98x10 <sup>-4</sup>	2,98x10 <sup>-4</sup>
	Cáliz	0,72x10 <sup>-4</sup> a (24,3)	0,91x10 <sup>-4</sup> a (28,7)
	Corola	1,05x10 <sup>-4</sup> a (35,3)	1,06x10 <sup>-4</sup> a (33,2)
	Androceo	0,37x10 <sup>-4</sup> a (12,5)	0,50x10 <sup>-4</sup> a (15,9)
	Gineceo	0,83x10 <sup>-4</sup> a (27,9)	0,15x10 <sup>-4</sup> a (22,2)
Relación de biomasa	Masc/Fem	0,45	0,72
	Repr/Veg	0,68	0,61
Producción promedio	Polen/flor	65,69 b	233,92 a
	Óvulo/flor	1,13 a	1,07 a
Relación	P/O	58,13	218,62

Las mediciones de la biomasa seca están expresadas en mg. Especies con letras iguales no presentan diferencias significativas al 5%. Valores entre paréntesis corresponden al porcentaje promedio de peso seco de cada parte floral. Masc: masculina, Fem: femenina, Repr: reproductiva, Veg: vegetativa, P: polen, O: óvulo.

## RELACIÓN SEMILLA/ÓVULO

Las especies *C. rotundifolium* y *C. venosum* resultaron ser altamente exitosas al transformar todos sus óvulos en semillas totalmente viables, no encontrándose diferencias significativas en el número de semillas/fruto para las especies.

La relación semilla/óvulo es un indicador de la cantidad de óvulos que no llegan a ser fertilizados o que son fertilizados pero abortados en estados tempranos de su desarrollo, y también de la producción eficiente de semillas y por tanto de la eficiencia reproductiva de una planta. La producción de semillas subterráneas fue notoriamente mayor que la producción de semillas aéreas, como se observa al comparar con los resultados expuestos por Aponte y Jáuregui (2019), por lo que la producción de estas semillas subterráneas genera importantes bancos de semilla en el suelo con las ventajas que ello implica. La eficiencia en la producción de semillas fue exitosa en estas especies anficárpicas (100%). En el caso de las semillas subterráneas, cabe mencionar lo señalado por Sutherland (1986), quien supone que la autogamia reduce la competencia entre granos de polen y por lo tanto, disminuye la asignación de recursos a la función masculina, con lo cual aumenta la aptitud femenina. El mismo autor también plantea que la autopolinización promueve la homocigosis, y en consecuencia disminuye la variación genética de las semillas. La capacidad de producir frutos y semillas subterráneas por autogamia pudo haber evolucionado como una manera de mantener un genotipo altamente adaptado a su ambiente, tal como es sugerido por Plitman (1973 citado por Speroni e Izagirre 2003), ya que el ambiente en el que se desarrollan estas flores es más constante, lo que permite mayor estabilidad para los procesos de esporogénesis, fecundación y desarrollo embrionario.

La presencia de fertilización cruzada en especies anficárpicas, la cual ocurre en las flores aéreas, y de autofertilización en las flores subterráneas, representan mecanismos que garantizan la variabilidad genética y la sobrevivencia de la especie, considerándose estos como una dualidad en el sistema reproductivo. Esta dualidad es considerada un *fitness* ventajoso para los taxones estudiados, como lo indican Koontz *et al.* (2017) para *Polygala lewtonii*, una especie con flores aéreas y subterráneas. La formación de flores subterráneas ofrece una reducción en la traslocación de recursos para la diferenciación de partes florales (menor tamaño, menor biomasa) y para la biosíntesis de pigmentos y asegura que las semillas formadas estén protegidas de depredadores y de condiciones ambientales desfavorables (Zhang *et al.* 2020).

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a Yajaira Guédez (Laboratorio de Ecología Agrícola), José Azkue (Centro de Microscopía Electrónica) y Norbelys Garcés (Laboratorio de Morfoanatomía Vegetal) por la colaboración prestada, todos de la Facultad de Agronomía de la UCV; también agradecen a Iraida Rodríguez (Instituto Nacional

de Investigaciones Agrícolas, del estado Anzoátegui) por facilitar las semillas, y a Rainer Schultze-Kraft (Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania) y Orlando Guenni (Laboratorio de Ecología Agrícola, antes indicado), por su gran apoyo y orientación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apezzato da Glória, B. 2003. Morfología de sistemas subterráneos, histórico e evolução do conhecimento no Brasil. Divisão de Biblioteca e Documentação-ESAL/USP. Brasil. 80 p.
- Aponte, Y. y D. Jáuregui. 2019. Morfoanatomía floral y algunos aspectos reproductivos de cinco especies de *Centrosema* (DC.) Benth. (Fabaceae). *Ernstia* 29: 1-40.
- Barbosa-Feverheiro, V.P. 1977. *Centrosema* (A.P. De Candolle) Benth. do Brasil Leguminosae-Faboideae. *Rodriguésia* 29: 159-219.
- Berzonsky, W., A. Hawk and T. Pizzolato. 1986. Anatomical characteristics of three inbred lines and two maize synthetics recurrently selected for high and low stalk crushing strength. *Crop Sci.* 26: 482-488.
- Charlesworth, D. and B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 237-268.
- Cheplick, G.P. 1987. The ecology of amphicarpic plants. *Trends Ecol. Evol.* 2: 97-101.
- Clements, R.J. 1990. *Centrosema* species for semiarid and subtropical regions. *In*: Schultze-Kraft, R. and R.J. Clements (Eds.). *Centrosema: biology, agronomy and utilization.* 1-27. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 765 p.
- Cocks, P.S. 1999. Reproductive strategies and genetic structure of wild and naturalised legume populations. *In*: Bennett, S.J. and P.S. Cocks (Eds.). *Genetic resources of Mediterranean pasture and forage legumes.* Ch. 2: 20-28. Springer Science and Business Media. Dordrecht, Holanda. 244 p.
- Conterato, I.O., M.T. Schifino-Wittmann, D. Guerra and M. Dall'Agnol. 2013. Amphicarpic in *Trifolium argentinense*: morphological characterization, seed production, reproductive behavior and life strategy. *Australian J. Bot.* 61: 119-127.

- Corredor, J.P. y J. García. 2011. Fenología reproductiva, biología floral y visitantes florales en los cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) Hilacha y Tommy Atkins en el valle del alto Magdalena (Colombia). Cienc. Tecnol. Agropecuaria. 12: 21-32.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding system in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Culley, T.M. and M.R. Klooster. 2007. The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution and ecology in Angiosperms. *Bot. Rev.* 73: 1-30.
- Cury De Barros, T., C. Ribeiro-Marinho, G. Donizete-Pedersoli, J. Vilella-Paulino and S. Pádua-Teixeira. 2016. Beyond pollination: diversity of secretory structures during flower development in different legume lineages. *Acta Bot. Bras.* 31: 358-373.
- Drewes, S.I. 2005. Morfología de estilos y estigmas en *Macropodium* (Fabaceae). *Kurtziana* 31: 29-38.
- Drewes, S.I. y P.S. Hoc. 2000. Morfología y desarrollo de flores cleistógamas en *Macropodium fraternum* (Fabaceae). *Kurtziana* 28: 229-238.
- Ghosh, S. and K.R. Shivanna. 1982. Anatomical and cytochemical studies on the stigma and style in some legumes. *Bot. Gaz.* 143: 311-318.
- Gopinathan, M.C. and C.R. Babu. 1987. Breeding systems and pollination in *Vigna minima* (Leguminosae, Papilionoideae). *Plant Syst. Evol.* 156: 117-126.
- Gunn, C.R. and J. Klive. 1976. Androecium and pistil characters for tribe Vicieae (Fabaceae). *Taxon* 25: 563-575.
- Heslop-Harrison, Y. and K. Shivanna. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41: 1233-1258.
- Jáuregui, D. 2011. Anatomía de los órganos vegetativos de *Centrosema venosum* Mart. ex. Benth. (Fabaceae). *Rev. Fac. Agron. (UCV)* 37: 129-136.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw Hill Book Company, Inc. New York, United States. 523 p.
- Kaul, V., A.K. Koul and M.C. Sharma. 2000. The underground flower. *Curr. Sci.* 78: 39-44.

- Koontz, S.M., C.W. Weekley, S.J. Haller-Crate and E.S. Menges. 2017. Patterns of chasmogamy and cleistogamy, a mixed-mating strategy in an endangered perennial. *AoB Plants* 9: plx059. DOI: 10.1093/aobpla/plx059.
- Lawn, R.J. and L.M. Bielig. 2016. Expression of amphicarpic morphotypes and their hybrids and implications for cultivar development. *Crop Pasture Sci.* 67: 978-987.
- Lloyd, D.G. 1965. Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Gray Herb. Harvard Univ.* 195: 3-134.
- Lloyd, D.G. 1987. Allocation to pollen, seeds and pollination mechanisms in self-fertilizing plants. *Funct. Evol.* 1: 83-89.
- Mansilla, R., C. López, M. Flores y R. Espejo R. 2010. Estudios de la biología reproductiva en cinco accesiones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) Robinson. *Ecol. Apl.* 9: 167-175.
- Müller, S. y R. Schultze-Kraft. 2000. Influencia del manejo y del medio ambiente. I Simposium Nacional: Experiencias con el género *Centrosema* en Venezuela. Universidad de Hohenheim e Instituto de Investigaciones Agrícolas. El Tigre, Anzoátegui, Venezuela.
- Nikolic, N., R. Schultze-Kraft, S. Müller and I. Rodríguez. 2005. Amphicarpic in perennials: *Centrosema rotundifolium*. In: Tielkes, E., C. Hülsebusch, I. Häuser, A. Deininger and K. Becker (Eds.). *The global food and product chain-dynamics, innovations, conflicts, strategies.* 357. Tropentag 2005, University of Hohenheim. Stuttgart, Germany. 482 p.
- Ramírez, N. 1992. Las características de las estructuras reproductivas, niveles de aborto y semillas producidas. *Acta Ci. Venez.* 43: 167-177.
- Rodríguez-Riaño, T., A. Ortega-Olivencia y J. Devesa. 1999. Biología floral en Fabaceae. *Monografías del Real Jardín Botánico, CSIC.* Tomo 16. Madrid, España. 180 p.
- Sakai, W. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technol.* 48: 247-249.
- Saravana-Kumar, P., R.J. Lawn and L.M. Bielig. 2012. Comparative studies on reproductive structures in four amphicarpic tropical Phaseoleae legumes. *Crop Pasture Sci.* 63: 570-581.

- Schmidt, A., R. Schultze-Kraft, B.L. Mass and R. Hermann. 1996. Aspects of the amphicarpny of the tropical pasture legume *Centrosema rotundifolium* Mart. ex Benth. *In*: W. Schoeberlein and K. Foerster (Eds.). Yield and quality in herbage seed production. Proceedings, Third International Herbage Seed Conference, 1995. p. 44-48. Halle (Saale), Germany.
- Schultze-Kraft, R. 2000. Importancia de *Centrosema* en el ámbito global. I Simposium Nacional: Experiencias con el género *Centrosema* en Venezuela. Universidad de Hohenheim e Instituto de Investigaciones Agrícolas. El Tigre, Anzoátegui, Venezuela.
- Schultze-Kraft, R. and R.J. Clements. 1995. *Centrosema*. *In*: Smartt, J. and N.W. Simmonds (Eds.). Evolution of crop plants. 255-258. Longman Scientific and Technical. Harlow, England. 496 p.
- Schultze-Kraft, R., R.J. Williams y L. Coradin. 1997. Biogeografía de *Centrosema*. *In*: Schultze-Kraft, R., R.J. Clements and G. Keller Grein (Eds.). *Centrosema*: biología, agronomía y utilización. 35-86. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 765 p.
- Speroni, G. y P. Izagirre. 2001. Morfología y esporogénesis en flores aéreas y subterráneas de la especie anficárpica *Trifolium polymorphum* (Fabaceae, Papilionoideae). Bol. Soc. Argent. Bot. 36: 253-265.
- Speroni, G. y P. Izagirre. 2003. Características biológicas de la leguminosa promisoriosa forrajera *Trifolium polymorphum* Poir. Agrociencia 7: 68-76.
- Sutherland, S. 1986. Patterns of fruit set: what controls fruit-flower ratios in plant? Evolution 40: 117-128.
- Tucker, S.C. 1987. Floral initiation and development in legumes. *In*: Stirton C.H. (Ed.). Advances in legume systematics, Part 3: 183-232. Royal Botanical Gardens. Kew, England. 1049 p.
- Uphof, J.C.T. 1938. Cleistogamic flowers. Bot. Rev. 4: 21-49.
- Zhang, Y., J. Yang, J. and G.Y. Rao. 2006. Comparative study on the aerial and subterranean flower development in *Amphicarpa edgeworthii* Benth. (Fabaceae: Papilionoideae), an amphicarpic species. Int. J. Plant Sci. 167: 943-949.

Zhang, K., J.M. Baskin, C.C. Baskin, G.P. Cheplick, X. Yang and Z. Huang. 2020. Amphicarpic plants: definition, ecology, geographic distribution, systematics, life history, evolution and use in agriculture. *Biol. Rev.* 95: 1442-1466.