

## Estructura y germinación de las semillas de *Bixa orellana* L. (achiote)\*

Dora I. Rivera

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

Eugenia M. Flores

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica

(Recibido para publicación el 31 de enero de 1983)

**Abstract:** Ovules of *Bixa orellana* L. are crassinucellate, bitegmic and have a micropyle formed by both integuments. Ovular position varies during development. Survival of the chalazal megaspore results in monosporic gametophyte. Fertilization is porogamous, and syngamy and triple fusion seem to occur simultaneously. The proembryo seems to be a massive coenocyte; later, it becomes cellular. The embryo is spatulate and the radicle is antitropous. Germination takes place through a chalazal canal next to the hilum. The outer integument contains the pigment bixine.

El achiote (*Bixa orellana*) es una especie distribuida desde México hasta Brasil. La utilización industrial del pigmento contenido en la testa de las semillas hace que su importancia económica sea cada vez mayor. Este es un excelente sustituto de algunos colorantes sintéticos, potencialmente tóxicos o carcinogénicos, gracias a la gran cantidad de bixina (Ingram y Francis, 1969; Kennard y Winters, 1963).

Las semillas son piriformes, de color rojizo, con abundante endosperma oleoso y bitegmicas. Según Chopra y Kaur (1965), el rudimento seminal presenta un saco embrional de tipo *Polygonum* y dos tegumentos multicelulares; cerca de la calaza, estos tienen 7 u 8 capas celulares.

Las semillas se localizan dentro de una cápsula dehiscente que se abre en dos valvas (Hutchinson, 1959; 1969; Lawrence, 1951; León, 1968; Standley, 1923; 1937).

En general, la información referente a la embriología de *Bixa orellana* y a los eventos que tienen lugar al iniciarse la germinación es fragmentaria. Por esta razón, en el presente estudio se describe el desarrollo y la estructura de los rudimentos seminales y de las semillas, en un intento de confirmar, modificar o ampliar la

información al respecto. También se ofrecen datos preliminares sobre el proceso de germinación de las semillas.

Al describir los rudimentos seminales se denomina lado dorsal, en funículo y rudimento seminal, a aquel lado que alcanza mayor desarrollo al curvarse el rudimento. El lado ventral del funículo, queda entonces próximo al lado ventral del tegumento externo y al micropilo.

### MATERIAL Y METODOS

El material utilizado en este estudio se colectó en varias localidades escogidas al azar en Alajuela, Heredia, Turrialba y Guanacaste. En todos los casos se escogieron frutos provenientes de plantas indígenas.

Los especímenes examinados con microscopio de luz, se fijaron en FAA (Johansen, 1940) y se infiltraron en Paraplast Plus. Se hicieron secciones transversales y longitudinales de 10-12  $\mu\text{m}$  de grosor y se les tiñó siguiendo la técnica de Sharman (1943). Se montó las secciones en Preservaslide y se les observó en un microscopio Leitz Dialux 20.

Para el examen con el microscopio electrónico de barrido se fijó el material en glutaraldehído al 4% en un amortiguador de cacodilato de sodio y HCl 0,05M, pH 7,0 durante 12

\* Parte de la tesis presentada por la primera autora con el fin de obtener el grado de Licenciado en la Universidad de Costa Rica.

horas a 23°C. Luego se deshidrató mediante series de alcohol etílico, transfiriéndose posteriormente a una solución 1:1 de acetato de amilo y etanol absoluto y más tarde a acetato de amilo puro. Los especímenes se sonicaron durante 2 ó 3 segundos para eliminar las impurezas y se llevó el material hasta el punto de secado crítico con CO<sub>2</sub>. Los especímenes se montaron en soportes de aluminio empleando cinta adhesiva y pintura conductora de plata. Se colocó el material en un cobertor iónico, donde se cubrió con una película de oro. Se observó las secciones en un microscopio de rastro Hitachi HHS-2R. Las fotografías se tomaron con película Verichrome Pan Kodak VP120.

Las pruebas de germinación se hicieron con semillas sobre papel de filtro humedecido, en cajas de petri. Se hicieron 12 ensayos con 50 semillas cada uno, incubándose éstas a temperatura ambiente. Se fijó diariamente 10 semillas que presentaran crecimiento similar, durante 12 días; éste se calculó midiendo la longitud de la radícula. Se disectó la mitad de estas semillas para extraer el embrión y se conservó las otras 5 como testigo. Se obtuvo un total de 12 estadíos, desde el inicio de la germinación, hasta el estadio posterior a la emergencia de los primordios foliares arriba de los cotiledones. Se dibujó y fotografió especímenes en diferentes estadíos de desarrollo.

## RESULTADOS

La semillas son piriformes, numerosas y se originan en placentas parietales (Fig. 1). Miden de 3 a 6 mm de largo y tienen una depresión longitudinal y una pequeña excrescencia en la porción distal que corresponde al micropilo (Figs. 1,2).

Durante la germinación, se observa emerger la radícula a través de la taza del hilo en la región proximal del rudimento (Fig. 3).

En estadíos tempranos, la pared ovárica de la cápsula presenta numerosos canales laticíferos. En el septo ovárico los haces que suplen las placentas presentan elementos traqueales anulares y helicoidales.

Las áreas epidérmicas vecinas a la placenta son papilares, con células de citoplasma denso. El resto de la pared del lóculo muestra células epidérmicas con vacuolas grandes llenas de sustancias fenólicas y algunos tricomas multicelulares cortos.

Numerosas protuberancias epidérmicas cubren la cápsula en el exterior. Tienen haces vasculares con ramificaciones muy bien definidas, a veces asociadas a canales laticíferos; también se observa en ellas algunos idioblastos con sustancias fenólicas. De la epidermis de dichas estructuras emergen tricomas multicelulares; algunos son de tipo escamoso, otros son cortos (Fig. 1).

Los rudimentos seminales de esta especie son ortótropos en su inicio. Se curvan en etapas muy tempranas de desarrollo, especialmente en la zona calazal y el micropilo (Figs. 4,5).

El funículo también tiene crecimiento diferencial en el extremo distal y se curva sobre el lado ventral (Figs. 4,5). Durante la antesis, los rudimentos adoptan una posición cercana a la anátropa, sin embargo, internamente se observa curvatura del micropilo. Esta se debe a mayor crecimiento del lado dorsal del rudimento. Después de la fecundación, el crecimiento diferencial es mayor del lado ventral del rudimento y del funículo. Cerca de la madurez, éste vuelve a presentar una posición casi ortótropa (Fig. 6); no obstante, persiste la curvatura del micropilo. Este crecimiento diferencial produce una torsión lateral del rudimento seminal hacia un costado. Este fenómeno se observa desde estadíos muy tempranos (Figs. 4,5), y se acentúa o se disminuye conforme crece el rudimento. Durante la antesis, es imposible obtener un plano medio del mismo en que se observe el micropilo (Fig. 8). Tampoco es factible obtener una sección que muestre el plano medio del micropilo ya que la abertura del tegumento interno se dirige en dirección contraria a la del tegumento externo.

El funículo es una estructura multicelular, glabra y curva cerca de la calaza (Figs. 4, 5). Su ensanchamiento cerca de la zona calazal del rudimento produce un hilo de gran amplitud en la semilla madura (Figs. 2, 6).

El haz vascular que suple al rudimento seminal termina en la calaza durante la época de la antesis. Posteriormente, se alarga sobre el lado ventral del rudimento seminal y alcanza la vecindad del micropilo.

Los rudimentos seminales estudiados son bitégmicos. El tegumento externo tiene usualmente 4 capas durante la época de la fecundación; más tarde, se vuelve masivo debido a las divisiones periclinales de las células que forman las capas originales (Fig. 8). En la vecin-

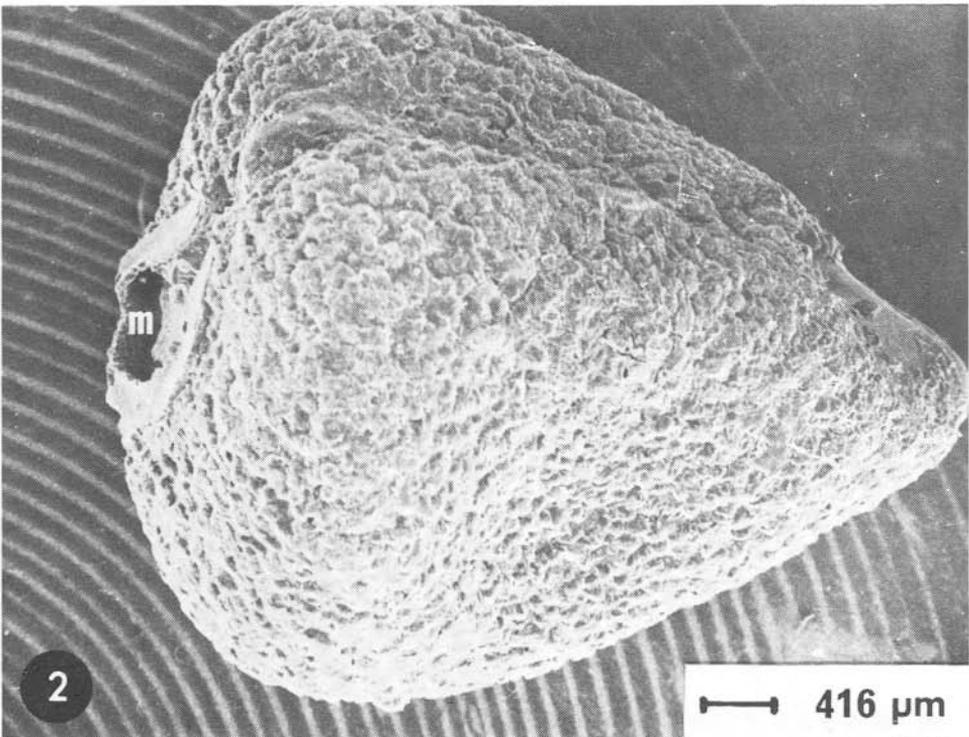
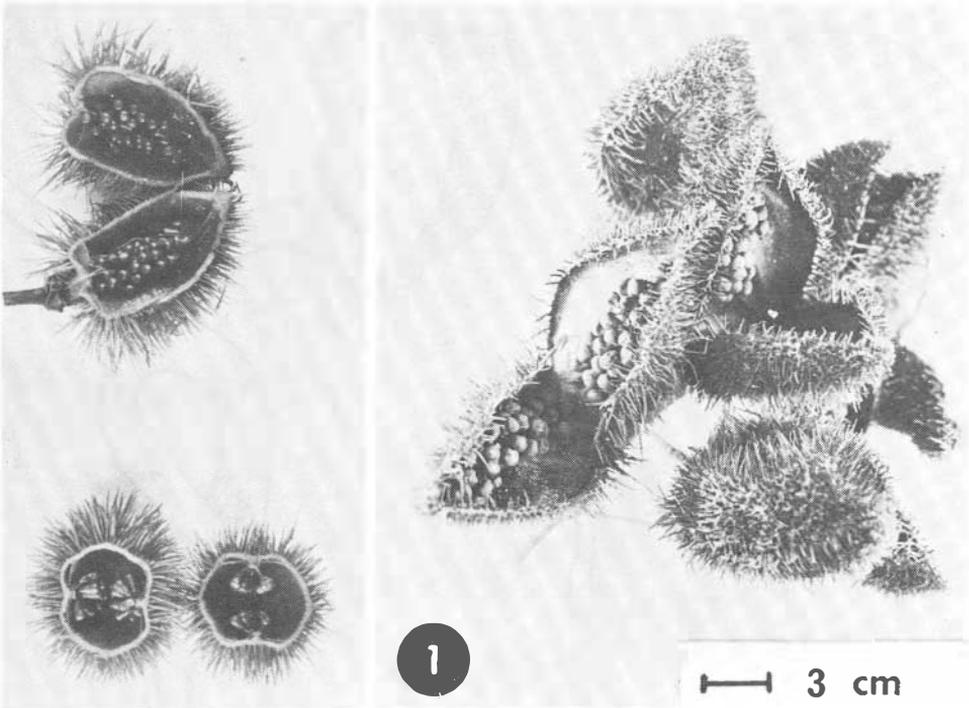


Fig. 1. Cortes longitudinales y transversales de frutos inmaduros de *B. orellana*. Obsérvese el tipo de placentación y la posición de las semillas y frutos inmaduros.

Fig. 2. Vista panorámica al microscopio electrónico de barrido, de una semilla madura. m, micropilo.

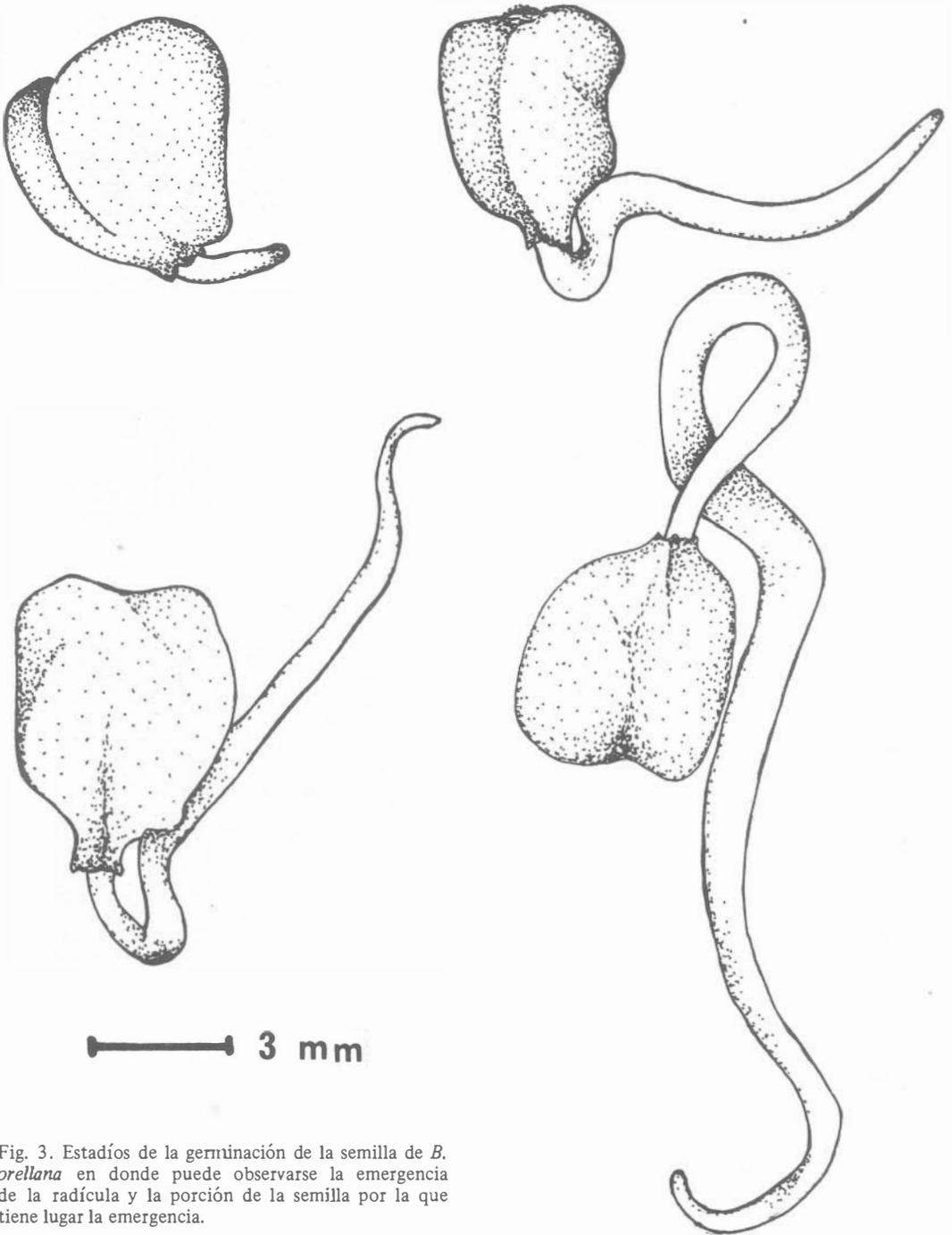


Fig. 3. Estadios de la germinación de la semilla de *B. orellana* en donde puede observarse la emergencia de la radícula y la porción de la semilla por la que tiene lugar la emergencia.

dad de la calaza y en la zona del micropilo, este tegumento tiene numerosas capas celulares desde muy temprano. El tegumento interno tiene 5 ó 6 capas celulares en la misma época; este número de capas aumenta hacia la zona micropilar.

Cuando el proembrión nuclear comienza a diferenciarse como un proembrión celular, las células de las capas medias del tegumento externo se dividen periclinalmente en su inicio, y luego en todas direcciones.

En el lado ventral del rudimento, este te-

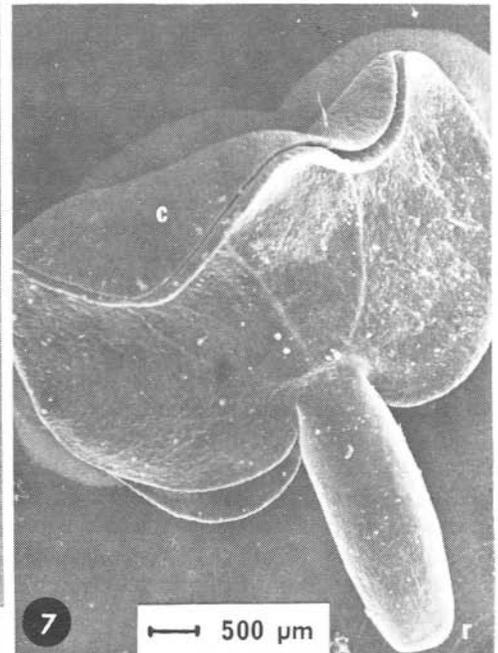
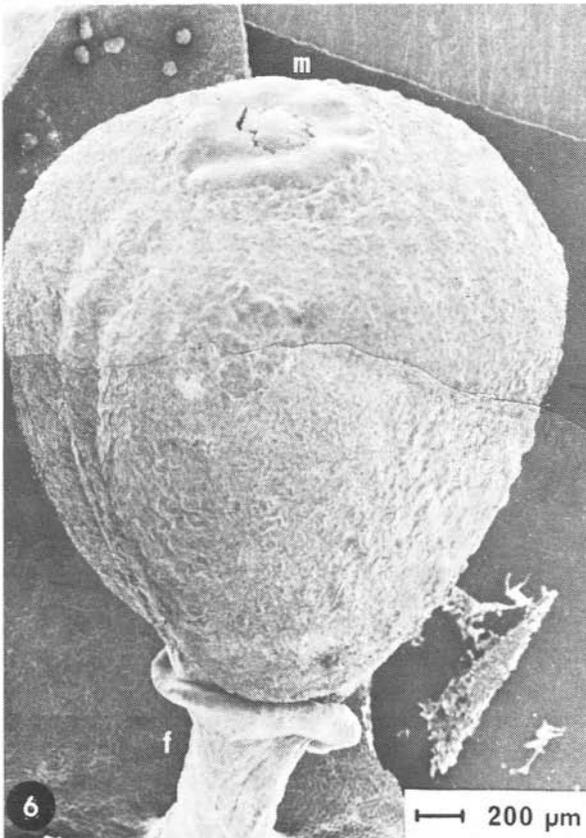
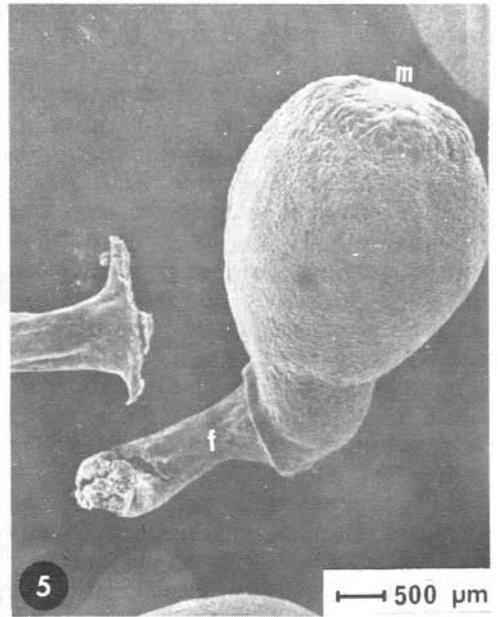
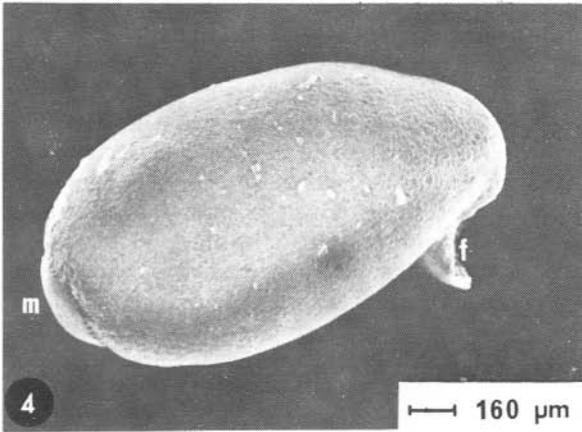


Fig. 4. Rudimento seminal inmaduro de *B. orellana* al microscopio electrónico de barrido.

Fig. 5. Rudimento seminal de mayor edad visto al microscopio electrónico de barrido.

Fig. 6. Semilla madura vista al microscopio electrónico de barrido. Obsérvese la posición del funículo sobre la placenta.

Fig. 7. Vista panorámica de un embrión de *B. orellana* de aproximadamente un día de desarrollo, al microscopio electrónico de barrido. m, micropilo; f, funículo; c, cotiledón; r, radícula.

gumento es mucho más grueso. A través de las capas centrales se observa la ramificación vascular proveniente del haz calazal. Inmediatamente después de esta proliferación celular se observa la formación de numerosos espacios lisígenos llenos de pigmento rojizo. Hacia la madurez, este tegumento está constituido por una epidermis externa de paredes y cutícula muy delgadas, grandes espacios llenos de pigmento en las capas medias y una epidermis interior formada por células anticlinalmente alargadas y de paredes suaves. La cutícula que cubre esta epidermis es también muy delgada (Fig. 8). Cuando se produce la dehiscencia del fruto, el tegumento externo se deshidrata y parte de los pigmentos acumulados en su interior se dispersan en forma de polvo.

El tegumento interno también multiplica el número de capas en esa misma época. No hay acumulación de pigmento en la zona central en esta estructura. La epidermis externa y la capa celular media se alargan anticlinalmente y ofrecen un aspecto acintado. La capa celular que se localiza debajo de la epidermis externa y la epidermis interna muestra células en cuyas vacuolas se observa un moderado contenido de pigmento.

En la zona micropilar se produce una multiplicación celular en ambos tegumentos, que finalmente obstruye el canal. Más tarde, se observa lignificación de algunas capas.

En la región calazal, del lado dorsal del rudimento y próximo al funículo, se diferencia un grupo de células que rellena una especie de canal (Fig. 8). Esta estructura se convierte en la primera abertura que permite la salida del embrión durante la germinación.

La nucela es crasinucelada y en general, recta. Sólo se diferencia una célula arqueopórica. La tétrada es lineal y la megaspora calazal es la que forma el saco embrional. La célula huevo ocupa una posición lateral. Las antípodas degeneran antes de la fertilización; las sinérgidas después. Esta se lleva a cabo por porogamia. La singamia y la formación del endosperma son simultáneas. El proembrión pudo observarse en el estado de dos células. Más tarde, sólo se encuentra una masa cenocítica en la cual se inicia una tardía formación de paredes celulares cerca de la zona micropilar; luego, se observa un proembrión multicelular. El embrión es alorricico de forma espatulada y la radícula es antitropa (Fig. 7). La radícula está cerca

de la zona calazal mientras que el extremo apical se ubica cerca del micropilo. Los cotiledones se doblan ligeramente hacia un lado en el extremo distal (Fig. 7).

El endosperma es nuclear e inicia la formación de paredes cerca del extremo micropilar. El megagametofito y el endosperma luego digieren poco a poco los remanentes del tejido nucelar. Durante el proceso de germinación, la radícula sale a través del canal vecino al funículo.

En los primeros estadios de desarrollo del embrión, el meristema apical tiene forma triangular en sección longitudinal y posteriormente tiende a aplanarse adquiriendo una forma biconvexa, de domo (Fig. 9). Posee una túnica uniseriada que cubre el cuerpo masivo. A ambos lados se observan bandas procambiales que se proyectan a todo lo largo hacia los cotiledones y la radícula. En primordios foliares y cotiledones es factible observar tricomas peltados muticelulares (Fig. 9).

Los cotiledones son bastante prominentes, redondeados y angostos, de 7 a 10 células de grosor, comprendiendo las epidermis y el mesófilo (Figs. 7,9). En los embriones con dos o más días de desarrollo se nota que las bandas procambiales de los cotiledones ya tienen algunos elementos traqueales diferenciados (Fig. 9). En la parte interna del cotiledón se nota la presencia de células grandes de contenido granular en grupos que aparentemente son células secretoras y que formarán posteriormente canales secretores (Fig. 9).

El meristema radical está protegido por una caliptra de 4 a 6 células de grosor, flojamente dispuestas, muy diferentes a las células de la rizodermis; en corte longitudinal pueden observarse células secretoras de contenido denso y granular (Fig. 10). Los pelos radicales se observan por primera vez en embriones con dos días de desarrollo.

## DISCUSION

Diversas posiciones embriológicas han sido empleadas para describir los rudimentos seminales de *Bixa* (Chopra y Kaur, 1965; Lawrence, 1951). En nuestra opinión, esto es explicable ya que el grado de curvatura de estos órganos varía en las diferentes etapas de desarrollo. Por lo tanto, la posición embriológica que se adjudique al rudimento se correlacionará estrechamente con el grado de desarrollo de los es-

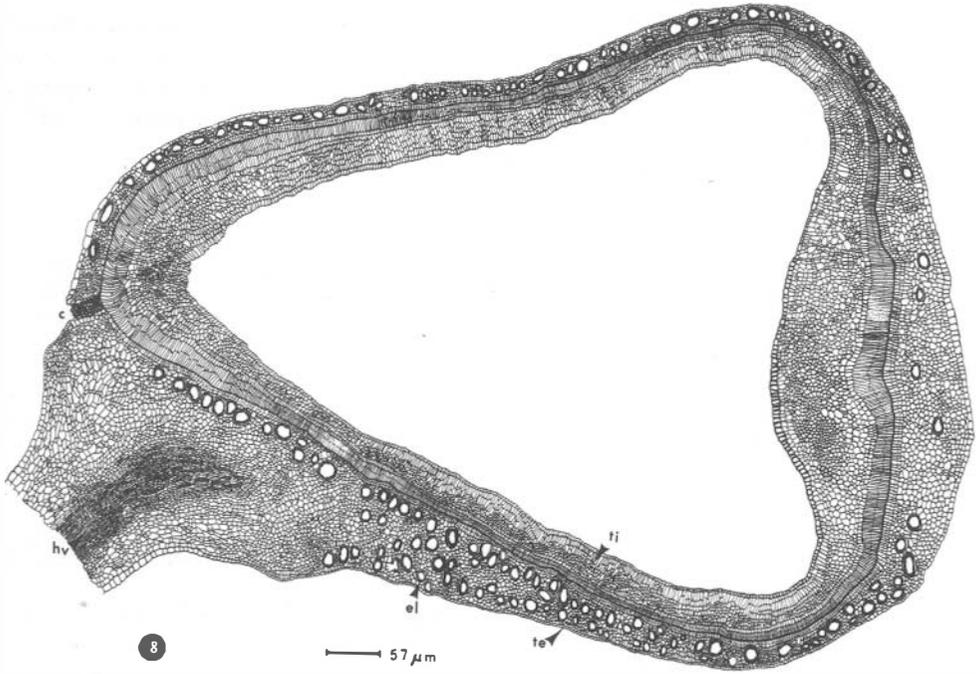


Fig. 8. Corte longitudinal de una semilla inmadura de *B. orellana*. te, tegumento externo; ti, tegumento interno; hv, haz vascular; c, canal; cl, espacios lisígenos.

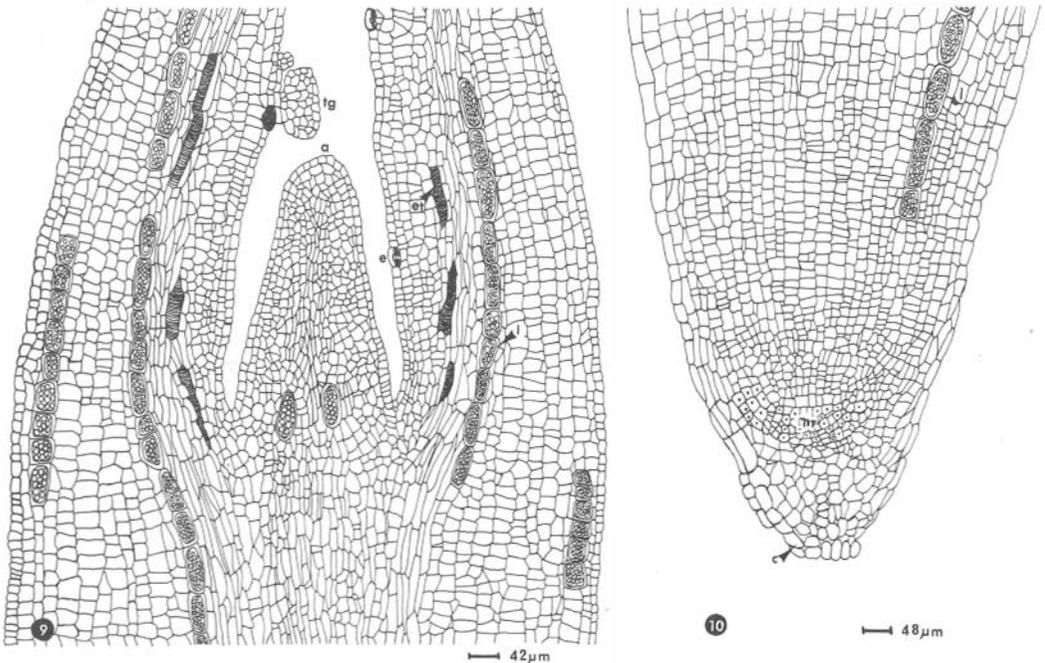


Fig. 9. Corte longitudinal de un embrión de *B. orellana* de aproximadamente 4 días de desarrollo; Se observa parte de los cotiledones y del hipocótilo; c, estoma; a, ápice. l, laticífero; ct, elemento traqueal; tg, tricoma glandular.

Fig. 10. Corte longitudinal del extramo de la radícula de un embrión de aproximadamente 3 días de desarrollo. c, caliptra; mr, meristema radical; l, laticífero.

pecímenes observados y la calidad de las secciones que se obtengan. Es interesante observar que tanto en *Bixa* como en taxa de otros grupos, se utilizan rudimentos seminales de diferentes edades y se les adjudica una determinada posición embriológica, omitiendo el hecho de que ésta puede variar durante el desarrollo del órgano. Si a esto se le suman posibles errores en su apreciación y la falta de parámetros bien definidos para medir la curvatura, se puede concluir que el utilizar la posición embriológica como un carácter de valor taxonómico no sólo carece de mucho valor, sino que puede inducir a error.

Los rudimentos seminales de *Bixa* tienen peculiaridades morfológicas que no se observan en la mayoría de las dicotiledóneas. Ejemplo de ello son la existencia de un embrión aparentemente nuclear y de un embrión con la radícula dirigida hacia la calaza. Chopra y Kaur (1965) se refieren a la embriogenia de *Bixa* indicando que es diferente a cualquier tipo conocido. Los proembriones nucleares han sido observados sólo en el género *Paeonia* (Yakovlev y Yoffe, 1957; Cave *et al.*, 1961). Este taxon es el único género de otra pequeña familia de la Subclase Dilleniidae (Cronquist, 1968; Takhtajan, 1969).

También es interesante el pequeño canal que se localiza cerca del funículo, en la zona calazal del rudimento y que proporciona la primera abertura de la zona por la que asomará la radícula durante la germinación.

Desde el punto de vista económico, es importante constatar que el pigmento utilizable para fines industriales se encuentra en las capas interiores del tegumento externo, que al secarse durante la dehiscencia del fruto pierde parte del pigmento. Se sugiere que una práctica conveniente es la de coleccionar y procesar las semillas antes de que esto ocurra.

## RESUMEN

Los rudimentos seminales de *Bixa orellana* L. son crasinucelados, bitégmicos y tienen el micropilo formado por los dos tegumentos. La posición ovular varía durante el desarrollo. La megaspora calazal sobreviviente forma el gametófito monospórico. La fertilización es porógama; la singamia y la triple fusión ocurren en forma simultánea. El proembrión es, en apariencia, un cenocito masivo; más tarde, se trans-

forma en celular. La posición del embrión dentro de la semilla es inversa a la de la mayoría de las dicotiledóneas. La germinación se inicia a través del canal calazal cercano al micropilo. El tegumento externo contiene el pigmento bixina.

## REFERENCIAS

- Cave, M.S.; H.J. Arnott & S.A. Cook. 1961. Embryology in the California peonies with reference to their taxonomic position. *Amer. J. Bot.* 43:397-404.
- Cronquist, A. 1968. The evolution and classification of flowering plants. Houghton Mifflin Co., Boston.
- Chopra, R.N. & H. Kaur. 1965. Embryology of *Bixa orellana* Linn. *Phytomorphology* 15: 211-214.
- Hutchinson, J. 1959. The families of flowering plants. Vol. I. 2a ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hutchinson, J. 1969. Evolution and phylogeny of flowering plants. Academic Press, New York.
- Ingram, J.S. & B.J. Francis. 1969. The annatto tree cultivation, preparation and uses. *Trop. Sci.* 11: 97-102.
- Johansen, D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co. New York.
- Kennard, W.C. & H.F. Winters. 1963. Frutas y nueces para el trópico. Trad. Centro Regional de Ayuda Técnica (R.T.A.C.) y la A.I.D. Ed. Limusa, México.
- Lawrence, G.H.M. 1951. Taxonomy of Vascular Plants. McMillan Publishing Co., New York.
- León, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. I.I.C.A. San José, Costa Rica.
- Sharman, B.C. 1943. Tannic acid and iron alum with safranin and orange G in studies of the shoot apex. *Stain Tech.* 18: 105-111.
- Standley, P.C. 1923. Trees and shrubs of México, Centro V. S. Herb. Vol. 23. Smithsonian Press, Washington.
- Standley, P.C. 1937. Flora of Costa Rica. Field Mus. Nat. Hist. Vol. XVIII, Chicago.
- Takhtajan, A. 1969. Flowering plants: origin and dispersal. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Yakovlev, M.S. & M.D. Yoffe. 1957. On some peculiar features in the embryogeny of *Paeonia* L. *Phytomorphology* 7: 74-82.