

MORFOANATOMÍA FLORAL Y ALGUNOS ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE CINCO ESPECIES DE *CENTROSEMA* (DC.) BENTH. (FABACEAE)

Yannely Aponte y Damelis Jáuregui

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

COMPENDIO

Centrosema (DC.) Benth. es considerado uno de los tres géneros más importantes de leguminosas forrajeras tropicales y de uso potencial para otros fines. En este trabajo se aporta información sobre la morfoanatomía de los verticilos florales de cinco de sus especies, la cual podría ser útil en los estudios de biología reproductiva y en el subsiguiente establecimiento de programas de mejoramiento. Se recolectaron flores, frutos y semillas de *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *C. molle*, *C. rotundifolium* y *C. venosum*, las dos últimas consideradas especies anficárpicas, pero este trabajo se refiere solo a flores aéreas. Se determinó el tamaño de las piezas florales y su peso seco, así como el área estigmática, número de óvulos por flor y semillas por fruto, y se estimaron algunas variables vinculadas con la biología reproductiva de cada uno de los taxones. Las piezas florales se procesaron siguiendo las técnicas clásicas para su observación con microscopio óptico y electrónico de barrido. Los resultados revelan que las flores de las especies de *Centrosema* estudiadas son semejantes morfoanatómicamente entre ellas; destaca *C. macrocarpum* por sus mayores dimensiones, y las especies anficárpicas, por tener las flores más pequeñas. La caracterización anatómica de los verticilos florales ofrece algunos caracteres importantes de revisar para verificar su valor diagnóstico, tales como las lobulaciones del nectario, la presencia de tricomas y estomas en esta estructura, las dimensiones de las papilas del estandarte, entre otras. Por otra parte, las especies se comportan como xenógamas facultativas con una producción de semillas por fruto relativamente alta. Se discuten algunos caracteres morfoanatómicos que pueden estar vinculados con

el mecanismo reproductivo en las especies estudiadas, entre ellos: el tamaño de la flor, la presencia de papilas en el estandarte, de hercogamia, de tricomas periestigmáticos y de cepillo polínico en el estilo.

PALABRAS CLAVE

Biomasa floral, estructura floral, nectario, relación polen/óvulo, relación semilla/óvulo.

FLORAL MORPHOANATOMY AND SOME REPRODUCTIVE ASPECTS OF FIVE SPECIES OF *CENTROSEMA* (DC.) BENTH. (FABACEAE)

ABSTRACT

Centrosema (DC.) Benth. is considered one of the three most important genera of tropical forage legumes and of potential use for other purposes. This work provides information on the morphoanatomy of fertile and sterile floral whorls of five of their species, which could be useful in reproductive studies and in the subsequent establishment of breeding programs. Flowers, fruits and seeds of *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *C. molle*, *C. rotundifolium* and *C. venosum* were collected, the last two species are considered amphicarpic, but this work refers only to aerial flowers. The size of the floral pieces and their dry weight, as well as the stigmatic area, number of ovules per flower and seeds per fruit were determined, and some variables related to the reproductive biology of each of the taxa were estimated. The flower pieces were processed following the classic techniques for observation with an optical and scanning electron microscope. The results reveal that the flowers of the species studied are similar; *C. macrocarpum* stands out for their larger dimensions and both amphicarpic species for having the smallest flowers. The anatomical characterization of the floral whorls offers some important checking features to verify their diagnostic value, such as lobulations of the nectary, the presence of trichomes and stomata in this structure, the dimensions of the standard petal papillae, among others. On the other hand, the species behave like facultative xenogamous ones with a relatively high seed production per fruit. Some morphoanatomic characters that may be linked to the reproductive mechanism in the studied species are discussed, among them: the flower size, the presence of papillae on the standard petal, the presence of hercogamy, the existence of peristigmatic trichomes and pollen brush in the style.

KEY WORDS

Floral biomass, flower structure, nectary, pollen/ovule ratio, seed/ovule ratio.

INTRODUCCIÓN

Centrosema (DC.) Benth. es un género de Fabaceae, Papilionoideae, perteneciente a la subtribu Clitoriinae, la cual se caracteriza por la presencia de flores resupinadas y tricomas uncinados (Fariñas 2000). Dicho género está constituido por 34 especies que son originarias de los trópicos y subtropicos del Nuevo Mundo; solo una especie se presenta también en zonas templadas del sureste de Estados Unidos de América y unas pocas especies han sido introducidas en el trópico del Viejo Mundo (Fantz 1999). Brasil es señalado como el centro de diversificación de este género por presentar la mayor diversidad de especies y un alto nivel de endemismo (Barbosa-Fevereiro 1977, Schultze-Kraft *et al.* 1997). 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).

El potencial de las especies de *Centrosema* aumenta si, alternativamente, se considera su uso para corte y acarreo, banco de proteína, para rotaciones largas como cultivos de cobertura, para la fijación de dunas en la prevención de la degradación y en el mejoramiento del suelo (Fariñas 2000, Schultze-Kraft 2000). Además, algunas investigaciones confirman su utilidad como suplemento alimenticio de pollos (Nworgu 2015, Lamire *et al.* 2019) y como fuente de algunos componentes importantes de uso farmacológico (Oladimeji *et al.* 2007). Por otra parte, algunas de estas especies poseen adaptabilidad particular a condiciones secas, condiciones de sombra, a suelos ácidos y de baja fertilidad (Flores y Schultze-Kraft 1994, Schultze-Kraft 2000). Tal capacidad de adaptación se debe, entre otros, a la presencia de: anficarpía, meristemas subterráneos, raíces pivotantes, xilopodios, ajustes osmóticos, movimientos de hojas para reducir la intercepción de luz, y otros (Schultze-Kraft 2000). Es por esto que dichos taxones constituyen un recurso genético valioso que podría ser útil para programas de fitomejoramiento (Schultze-Kraft 2000).

En Venezuela se han reportado 15 especies nativas de este género (Aymard y Fantz 2008): *C. acutifolium* Benth., *C. angustifolium* (Kunth) Benth., *C. brasilianum* (L.) Benth., *C. grazielae* V.P. Barbosa, *C. macrocarpum* Benth., *C. molle* Mart. ex Benth., *C. pascuorum* Mart. ex Benth., *C. plumieri* (Turpin

ex Pers.) Benth., *C. sagittatum* (Humb. et Bonpl.) Brandegees ex Riley, *C. schottii* (Millsp.) K. Schum, *C. tetragonolobum* Schultze-Kr. et R.J. Williams, *C. triquetrum* (Hoffmanns. ex Benth.) Benth., *C. venosum* Mart. ex Benth., *C. vexillatum* Benth. y *C. virginianum* (L.) Benth.

Centrosema venosum es una especie nativa, la cual presenta anficarpía, mecanismo de reproducción mediante el cual la misma planta produce frutos aéreos y subterráneos, teniendo la capacidad para regenerarse continuamente desde el banco de semillas que existe en el suelo y contribuyendo a la persistencia de las plantas bajo pastoreo (Schultze-Kraft *et al.* 1994, Müller y Schultze-Kraft 2000, Schultze-Kraft 2000, Zhang *et al.* 2020); sin embargo, no ha sido posible cultivarla en condiciones artificiales de invernadero o de vivero, por lo que la multiplicación de germoplasma y su conservación son problemas no resueltos todavía (Schultze-Kraft *et al.* 1997). Por otra parte, en el banco de germoplasma del CIAE-Anzoátegui existe una colección de *C. rotundifolium* Mart. ex Benth., la cual fue introducida debido a su alta producción de materia seca y semillas, y también por la presencia de anficarpía (Müller y Schultze-Kraft 2000, Rodríguez *et al.* 2000).

Los estudios morfoanatómicos de las diferentes partes florales de las Papilionoideae son reseñados en la literatura por su importancia taxonómica y filogenética (Gunn y Kluge 1976, Stirton 1981, Gohs y Shivanna 1982, Etcheverry *et al.* 1999, Drewes y Hoc 2000, Etcheverry *et al.* 2003, Speroni e Izaguirre 2003, Tandon *et al.* 2003, Prenner 2004, Drewes 2005, Drewes y Gamba 2011, Bortolin-Costa *et al.* 2014). Sin embargo, son escasos los señalamientos directos sobre su importancia en la comprensión de los mecanismos reproductivos que operan en las plantas. Se debe destacar el trabajo efectuado por Stirton (1981), quien indicó que las flores de esta subfamilia han seguido diferentes líneas de evolución, por lo que muestran especializaciones en estructura y función ligadas no solo a diferentes tipos de polinizadores sino también a distintos sistemas reproductivos. Asimismo, señaló que la aparición de tal diversidad debe requerir de numerosos compromisos a nivel estructural y funcional dentro y entre las distintas partes de la flor.

En numerosos trabajos sobre biología floral, las caracterizaciones morfoanatómicas son un componente importante, ya que ayudan en la interpretación de la funcionalidad de cada componente floral; por ejemplo, estudios anatómicos revelaron la presencia de un nectario epimorfo en la base del ginóforo de dos cultivares de *Dictamnus albus* L. (Rutaceae) al cual

fue posible determinarle su altura y el grosor del tejido secretor, así como la densidad estomática, variables involucradas directamente en la producción de néctar (Weryszko-Chmielewska *et al.* 2001). Asimismo, características estructurales y ultraestructurales de los estigmas de especies de *Erythrina* L. y de *Macroptilium* (Benth.) Urb. fueron relacionadas con rasgos del polen y de los polinizadores (Basso-Alves *et al.* 2011). En el trabajo de Bortolin-Costa *et al.* (2014) se discute el vínculo que existe entre la diversidad estigmática presente en las leguminosas tropicales con la clasificación de estigmas, los polinizadores y los sistemas de reproducción sexual.

Por consiguiente, conociendo el valor de las características morfoanatómicas en la taxonomía y en la reproducción de las diferentes plantas, este trabajo pretende aportar información sobre la morfoanatomía de los verticilos florales fértiles y estériles y algunos aspectos reproductivos de especies de interés agronómico del género *Centrosema*, con el fin de identificar rasgos de posible valor diagnóstico a nivel específico y características de utilidad en los estudios de biología reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Los taxones estudiados se ubican en el género *Centrosema*, el cual se caracteriza por presentar flores hermafroditas, zigomorfas, pentámeras, las cuales se disponen solitarias o en inflorescencias axilares. El cáliz es gamosépalo con tubo profundamente partido. La corola es violácea, rosada, blanca, azulada o amarilla y resupinada. El androceo es diadelfo; está formado por diez estambres con los filamentos de nueve de ellos fusionados formando un tubo abierto que casi rodea al ovario, quedando libres en su porción terminal, y un estambre vexilar abierto; las anteras son orbiculares. Es evidente un nectario discoidal ubicado entre el tubo estaminal y la base del ovario. El ovario es subsésil, piloso; estilo glabro, persistente en el fruto; estigma membranáceo, de ápice truncado o emarginado, raro engrosado, barbado. El fruto es una legumbre con semillas cilíndricas, oblongas, comprimidas, de testa lisa, oscuras cuando secas (Barvosa-Fevereiro 1977).

Las cinco especies de *Centrosema* estudiadas, se distinguen principalmente por: tipo y forma de las hojas, tipo de inflorescencia, tamaño relativo de los lóbulos del cáliz, tamaño y color de las flores y por la forma y tamaño de los frutos (Barvosa-Fevereiro 1977, Fariñas 2000).

PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL Y SIEMBRA

En los taxones *C. macrocarpum*, *C. molle*, *C. brasilianum* y *C. venosum* se recolectaron flores y frutos 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. Para ello fue necesario realizar varias visitas, unas para recolectar flores y las otras para recoger frutos.

La especie anficárpica *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 semillas originales de esa plantación procedían de distintas accesiones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) identificadas como: CIAT 5260, 5283, 5521, 5721, 25120 y 25148.

MORFOANATOMÍA FLORAL

Para el estudio morfológico de las flores se recolectaron 30 flores por cada especie, procedentes de distintos individuos; las mismas fueron fijadas en una solución de FAA (formaldehído, ácido acético glacial y etanol 70%). Posteriormente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y utilizando una micro-regla milimetrada, se determinaron las dimensiones de las piezas del perianto, del androceo y del gineceo (se consideró el cambio de forma y de anchura para delimitar el estilo del ovario). También se determinó la distancia antera-estigma, considerando para ello la diferencia entre la longitud del gineceo y la longitud del androceo (Eynard y Galetto 1999), pero usando solo los valores promedio de cada variable en cada especie.

Además, se recolectaron 10 flores frescas por cada especie con el fin de estimar el área estigmática. Para esto, se montaron en láminas temporales y se dibujó su contorno con ayuda de un microscopio óptico con tubo de dibujo acoplado (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).

Con el fin de efectuar la caracterización anatómica de las partes florales de las cinco especies bajo estudio, se tomaron cinco flores provenientes de individuos diferentes para cada especie. Las muestras recolectadas 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 de $\pm 6 \mu\text{m}$. 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

El estudio de la micromorfología del estandarte se realizó en cinco flores por especie, provenientes de diferentes individuos. Para ello se utilizó la terminología propuesta por Stirton (1981) teniendo en cuenta que la misma está dirigida a las alas. En estas flores se estudió adicionalmente la micromorfología estigmática y la porción próxima del estilo, considerando: forma de la superficie estigmática, presencia o no de papilas, características de las papilas estigmáticas, si están presentes, y disposición y tipo de tricomas del cepillo polínico.

En ambos casos las piezas florales se deshidrataron en una serie creciente de alcohol etílico (70, 90 y 100%), luego se colocaron en acetona (100%), se secaron por punto crítico, se montaron sobre bases porta-muestras y se metalizaron con oro-paladio (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), UCV.

ESTIMACIONES DE ALGUNAS VARIABLES INVOLUCRADAS EN LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

Asignación de recursos: se determinó el peso seco de las siguientes partes florales: cáliz, que representa la parte vegetativa de soporte; corola, como la parte vegetativa de atracción; y androceo y gineceo, como las partes reproductivas. Para ello se tomaron 30 flores recién abiertas provenientes de diferentes individuos, las cuales se separaron en: cáliz, corola, estambres y gineceo (no se incluyó el nectario); 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 floral por el peso seco promedio del cáliz, la corola y del nectario. 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 y para atraer polinizadores (Ramírez 1992).

- Relación polen/óvulo (P/O): esta relación se determinó siguiendo la metodología descrita por Cruden (1977). El número de granos de polen por antera se estimó en una suspensión de 5 hasta 20 anteras cerradas, variando el número de anteras de acuerdo a la especie. Las anteras provenían de flores de individuos diferentes (una antera/flor/planta) y las mismas fueron colocadas en una piedra de toque y se le agregó una gota de solución acetolítica (una parte de ácido sulfúrico en nueve partes de ácido acético anhidro). Esta se dejó secar por varias horas y, en el caso de que las anteras no abrieran por sí solas, 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, se mezcló durante 30 segundos la solución y se transfirió una gota de la misma a cada una de las cámaras de Neubauer (dos cuantificaciones 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 observación 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 para obtener el número de granos presentes por antera. El número de granos de polen por flor se estimó 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).
- Relación semilla/óvulo: para calcular el número promedio de semillas por fruto se realizó un conteo directo de las semillas formadas 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 todas 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%, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre las especies. Para identificar cuáles especies son similares entre sí en cuanto a las variables consideradas, se utilizó la prueba de comparaciones de medias de Tukey.

Con la finalidad de establecer posibles relaciones de similitud entre las especies estudiadas, así como para determinar algunos caracteres que podrían tener valor en la discriminación de las mismas, se utilizó la técnica de análisis de componentes principales usando una matriz de correlaciones, y a las variables obtenidas del mismo, se les aplicó el análisis discriminante de Mahalanobis, para conocer cuáles variables aportan la mayor varianza en los primeros componentes principales, y estimar así caracteres útiles como descriptores de los grupos bajo estudio. El análisis de componentes principales permite determinar las relaciones entre las unidades taxonómicas operativas (OTU) y el valor discriminatorio de los caracteres con respecto a las relaciones establecidas entre las primeras (Crisci y López 1983).

Los estadísticos descriptivos, los análisis de varianza y las pruebas de comparaciones de medias de Tukey se obtuvieron utilizando el software Statistix 8.0 para Windows. El análisis de componentes principales y el análisis discriminante se procesaron con el software Minitab 14.3 para Windows.

RESULTADOS

MORFOANATOMÍA FLORAL

Las dimensiones del cáliz mostraron diferencias significativas entre las especies (Tabla I). *Centrosema macrocarpum* es la especie con mayor tamaño del cáliz, tanto de largo como de ancho. Por su parte, *C. brasilianum* tuvo la menor longitud de esta pieza, mientras que las flores de *C. rotundifolium*, resultaron tener el cáliz menos ancho, mostrando las otras especies valores intermedios; las piezas de este verticilo son pubescentes dorsalmente.

Tabla 1. Valores promedio y desviación estándar de las variables morfológicas medidas en flores de especies de *Centrosema*.

Variables	<i>C. brasilianum</i>	<i>C. macrocarpum</i>	<i>C. molle</i>	<i>C. rotundifolium</i>	<i>C. venosum</i>							
Cáliz	Largo	5,8±1,7	d	17,9±2,1	a	9,6±0,9	c	10,3±2,6	c	11,9±1,4	b	
	Ancho	10,5±1,5	b	16,9±3,8	a	11,2±1,0	b	9,4±2,1	c	11±0,9	b	
Estandarte	Largo	30,6±3,2	b	35,9±2,7	a	28,3±2,9	b	17,2±1,9	d	24,7±2,2	c	
	Ancho	39,1±4,9	b	45,3±2,7	a	34,7±1,7	c	26,2±2,6	e	31,1±2,4	d	
Corola	Largo	22,4±2,2	c	37,6±2,7	a	24,7±2,3	b	20,8±1,6	c	18,6±1,2	d	
	Ancho	5,0±0,5	c	7,9±1,5	a	6,3±0,8	b	6,1±1,0	b	4,8±0,6	c	
Quilla	Largo	21,3±2,3	c	34,3±3,6	a	25,4±2,6	b	16,5±0,6	d	18,0±1,3	d	
	Ancho	10,8±0,9	c	18,4±2,1	a	13,1±0,6	b	8,9±0,5	d	9,6±0,9	d	
Androceo	Tube+	26,7±2,3	c	43,6±1,9	a	30,3±2,2	b	23,3±1,8	d	23,7±1,6	d	
Filamento	Diámetro	2,5±0,3	b	3,3±0,4	a	1,8±0,2	d	1,6±0,2	e	2,0±0,2	c	
	Antera	Largo	0,56±0,04	e	2,16±0,2	a	1,2±0	b	0,96±0,01	c	0,83±0,08	d
Largo del pistilo	Ancho	0,13±0,1	d	1,66±0,17	a	1,3±0,16	b	0,18±0,2	d	0,81±0,37	c	
	Área del estigma	3,9±1,2	cd	5,85±0,5	a	4,46±0,7	bc	2,9±0,7	d	5,48±1	ab	
Gineceo	Estigma	Ancho	1,7±0,4	b	2,5±0,1	a	2,0±0,1	b	1,6±0,2	b	1,9±0,18 x 10 ⁻³	b
	Estilo	Largo	11,2±0,6	d	18,6±2,3	a	17,0±2,2	ab	15,7±1,4	bc	15,1±2,1	c
	Ancho	0,4±0,1	c	0,7±0,2	b	0,5±0	c	0,9±0,01	a	0,5±0	c	

Tabla I. Continuación.

Variables	<i>C. brasiliense</i>	<i>C. macrocarpum</i>	<i>C. molle</i>	<i>C. rotundifolium</i>	<i>C. venosum</i>
Ovario	Largo 15,1±0,7	b 24,2±2,3	a 14,5±1,8	b 7,8±0,7	d 9,0±0,8
	Ancho 0,8±0,2	c 1,1±0,7x10 ⁻³	a 1,0±0	b 1,0±0,2	b 0,9±0,9x10 ⁻³
Número de óvulos	18,77±1,5	b 24±1,93	a 16,1±1,75	c 6,57±0,86	e 9,3±1,6
Fruto	Largo 104,6±15,8	b 172,1±17,6	a 95,2±20,3	b 40±3,5	d 68,4±3,7
	Ancho 4,4±0,4	d 6,3±0,3	b 5,5±0,4	c 7,9±0,6	a 5,6±0,4
Número de semillas	12,8±4,71	b 16,4±5,0	a 12,2±2,7	b 5,5±1,5	d 8,7±1,4

Mediciones expresadas en mm. Especies con letras iguales no presentan diferencias significativas al 5%.

La anatomía de los sépalos es muy similar entre las especies, por lo que se describen en forma general, destacando solo cuando difieren en alguna característica. Tienen epidermis uniestratificadas (Fig. 1A); las células epidérmicas de la superficie adaxial son mayormente rectangulares con la pared externa más cutícula delgada. En la superficie abaxial las células son rectangulares, de contenido denso, con la pared externa más cutícula ligeramente engrosada en *C. rotundifolium* y *C. venosum*, y delgada en el resto de los taxones; tiene tricomas uncinados, bicelulares, y tectores también bicelulares, de ápice agudo (Figs. 1B y 1C); con estomas evidentes en esta epidermis (Fig. 1D). El mesofilo está constituido por cuatro a cinco capas de parénquima, relativamente compacto, aunque en *C. brasilianum* y *C. venosum* se desarrollan espacios intercelulares amplios. En la nervadura central, las células parenquimáticas próximas a la superficie abaxial son más grandes (Fig. 1A); el sistema vascular está poco desarrollado, constituido por haces colaterales cerrados y con un arco esclerenquimático, de mayor o menor desarrollo, ubicado hacia la región floemática (Fig. 1A).

Con relación a las dimensiones de las piezas de la corola se observaron diferencias significativas entre las especies (Tabla I). En cuanto al estandarte, nuevamente *C. macrocarpum* y *C. rotundifolium* presentaron los extremos en cuanto a tamaño. Las alas de *C. venosum* fueron las más cortas y, junto a las de *C. brasilianum*, también fueron las más estrechas. De nuevo, *C. macrocarpum* es la especie con los valores mayores de longitud y anchura. Las especies ancícarpicas *C. rotundifolium* y *C. venosum* presentaron los menores valores en longitud y ancho de esta pieza floral y *C. macrocarpum* presentó los mayores valores. El arreglo histológico del estandarte fue semejante entre las especies estudiadas, por lo que se presenta una descripción general, destacando solo los rasgos disímiles. Esta porción de la corola presenta una capa de epidermis adaxial con células papilosas, cuya anchura decrece hacia el ápice (Figs. 1E-1H), y son más largas en *C. molle* que en el resto de las especies; tales células son cónicas con estrías radiales hacia la base y engrosamiento cuticular marcado hacia el ápice, con cutícula ornamentada, tienen un núcleo grande y contenido citoplasmático más abundante y denso que el de las células parenquimáticas del mesofilo. En la epidermis abaxial se presentan células rectangulares y cuadrangulares (Fig. 1E), con tricomas similares a los observados en el cáliz. En el margen fue evidente la presencia de células globosas entremezcladas con tricomas tectores. El mesofilo está constituido por varias capas de células parenquimáticas relativamente grandes

y arregladas laxamente (Figs. 1E y 1F). El tejido conductor se dispone a mitad del mesofilo de este antofilo y está constituido por haces colaterales cerrados sin esclerenquima asociado (Figs. 1E y 1F).

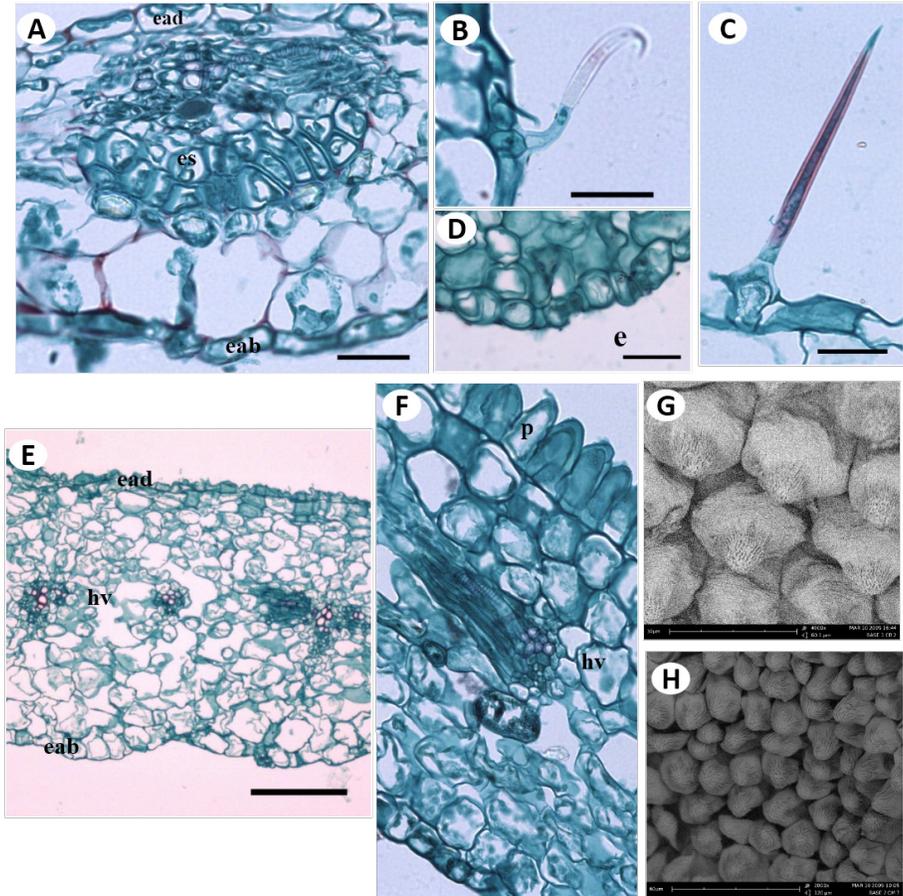


Fig. 1. Anatomía del perianto en especies de *Centrosema*. A. *C. molle*, sépalo en sección transversal; nótese arco esclerenquimático próximo al floema. B. *C. brasilianum*, tricoma uncinado en epidermis abaxial del cáliz. C. *C. brasilianum*, tricoma tector en epidermis abaxial del cáliz. D. *C. rotundifolium*, cáliz en sección transversal; nótese estomas. E. y F. *C. rotundifolium*, vista general y detalle del estandarte. G. y H. *C. brasilianum* y *C. macrocarpum*, papilas en la epidermis adaxial del estandarte (vistas al MEB). e: estoma; ead: epidermis adaxial; eab: epidermis abaxial; es: esclerenquima; hv: haz vascular; p: papila. Barras: A-C, E-F = 30 μm , D = 100 μm .

Las dimensiones de las piezas del androceo se muestran en la Tabla I. La longitud y diámetro del tubo más filamento estaminal es variable. Las mayores dimensiones se presentaron en *C. macrocarpum*, mientras que en *C. rotundifolium* y *C. venosum* se registraron los valores más bajos. El tubo estaminal y los filamentos son glabros. La estructura anatómica de los estambres resultó similar entre las especies, por lo que se presenta una descripción general, resaltando los rasgos que muestran alguna diferencia. El tubo estaminal está revestido por una epidermis de células cuadrangulares y rectangulares, de paredes ligeramente engrosadas, principalmente la periclinal externa, la cual, además, presenta una cutícula ligeramente gruesa y ornamentada. Seguidamente, se presenta parénquima formado por células redondeadas, de paredes delgadas, relativamente compacto (Figs. 2A y 2B), y 10 haces anficribales con parénquima asociado al xilema. Próximo a cada haz vascular existen células del parénquima con un contenido celular que se tiñó de color pardo (Fig. 2B). La porción libre de cada filamento es cilíndrica y está revestida por epidermis con células de contenido denso, cuatro a cinco capas de parénquima y un haz vascular anficribal (Fig. 2C). El conectivo ocupa la porción central de la antera (Figs. 2D y 2E), es relativamente amplio y está constituido por células de formas diversas, donde las que hacen contacto directo con el saco polínico presentan engrosamientos similares a los del endotecio, mientras que el haz conductor está rodeado por células de paredes delgadas. En este último, se observaron pocos vasos xilemáticos con engrosamientos del tipo espiralado y células floemáticas con contenido bastante denso. Además, son evidentes inclusiones celulares, granulosas o no, en el interior de varias de sus células. Las anteras más largas se observaron en *C. macrocarpum*, mientras que en *C. brasilianum* son más cortas que en el resto de las especies (Tabla I); esta especie, junto a *C. rotundifolium*, mostró los menores valores en la anchura de las anteras. Anatómicamente, presentan exotecio uniestratificado formado por células rectangulares, con pared externa ligeramente convexa y cutícula delgada. El endotecio está formado por un estrato de células relativamente grandes, rectangulares, orientadas anticlinalmente, con engrosamientos fibrosos de tipo helicoidal (Fig. 2F). Hacia la cara interna del saco polínico se observa una capa de células medias y restos del tapete, cuyas células en ocasiones muestran fuerte tinción con el colorante (Fig. 2F). Dentro de las tecas se observan abundantes granos de polen. El estomio está formado por células del exotecio de paredes delgadas (Fig. 2E), por lo que tienden a colapsar.

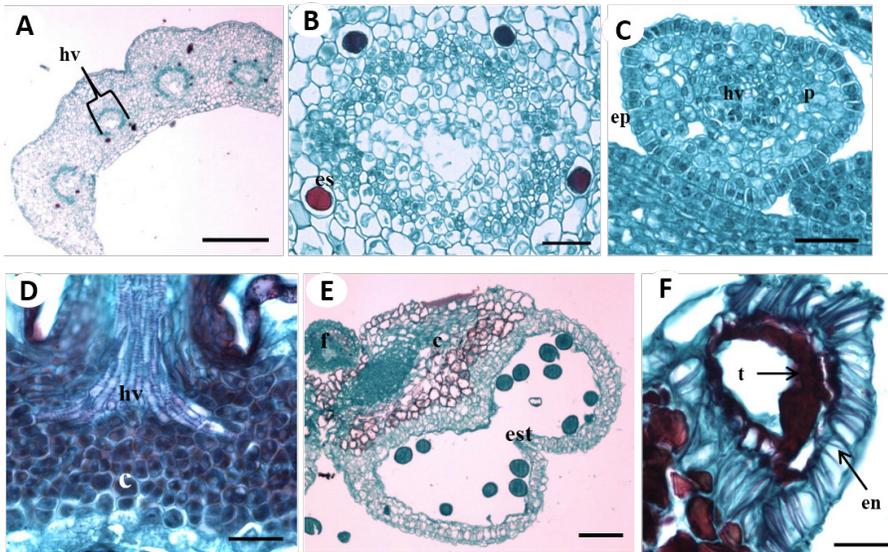


Fig. 2. Androceo en especies de *Centrosema*. A. *C. venosum*, vista parcial del tubo estaminal en sección transversal. B. Detalle de una porción de dicho tubo; nótese tejido vascular y células de contenido oscuro. C. *C. venosum*, transcurso del filamento estaminal. D. *C. rotundifolium*, tejido conectivo en sección longitudinal; nótese células con contenido denso y oscuro. E. *C. venosum*, transcurso de una porción de la antera. F. *C. rotundifolium*, saco polínico mostrando fuerte tinción del tapete y engrosamientos del endotecio. c: conectivo; en: endotecio; ep: epidermis; es: estructura secretora; est: estomio; f: filamento; hv: haz vascular; p: parénquima; t: tapete. Barras: A = 300 μ m, B, D, F = 30 μ m, C, E = 100 μ m.

El nectario floral mide de 0,5-2,4 mm de altura (sin discriminar su valor entre las especies) y es de margen liso en *C. brasilianum*, *C. molle* y *C. venosum* (Figs. 3A-3C) y ligeramente lobulado en las otras dos especies, observándose hasta 10 lóbulos (Figs. 3D y 3E). En todos los nectarios fue evidente un surco pronunciado (Fig. 3D). Se observaron estomas sobre el borde superior de la superficie externa del nectario solo en *C. venosum* (Fig. 4F). En todas las especies fueron evidentes tricomas tectores en la superficie externa; no obstante, solo *C. molle* presentó apéndices en la epidermis interna del nectario, los cuales son uni o bicelulares, largos y cortos (Fig. 3C), en algunos casos bi-ramificados. En sección transversal (Fig. 3G), se observa la epidermis uniestratificada con células revestidas por cutícula engrosada desigualmente, con poco contenido celular, generalmente con una gran vacuola, seguida por parénquima con células isodiamétricas, compactas, de contenido denso,

cada una con un núcleo evidente y vacuolas pequeñas. Es común encontrar cristales romboédricos en este tejido (Fig. 3H). El nectario es estructural y vascularizado, ya que lo recorren hasta 10 trazas de floema, que llegan casi hasta el ápice (Fig. 3I).

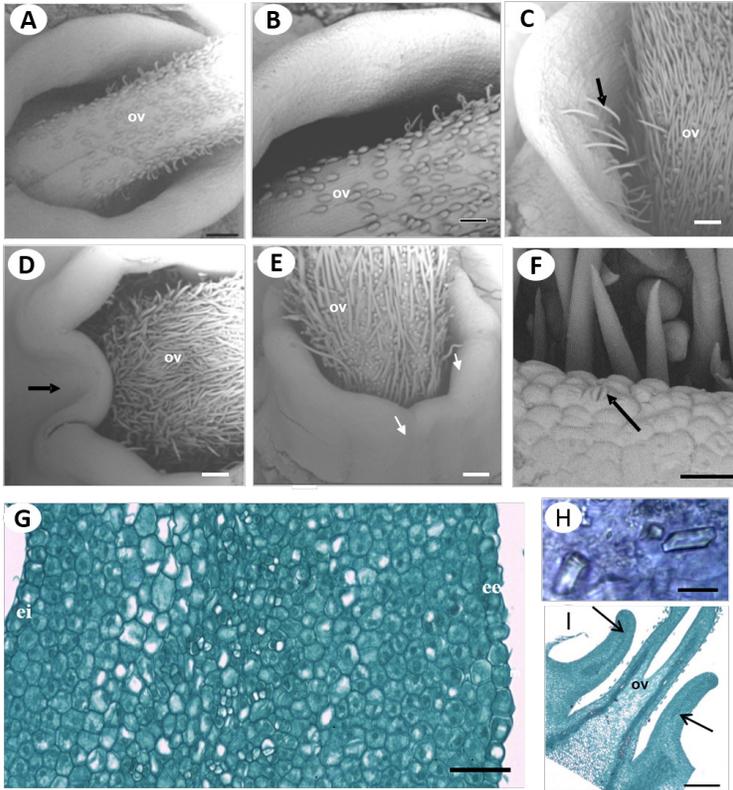


Fig. 3. Nectario en especies de *Centrosema*. A-F. Fotomicrografías en el microscopio de barrido. G-I. Fotomicrografías bajo microscopio óptico. A. *C. brasilianum*, vista general. B. Detalle de la figura anterior. C. *C. molle*, nótese tricomas tectores en la epidermis interna (indicados con flecha). D. *C. macrocarpum*, nótese lobulación y surco pronunciado (indicado con flecha). E. *C. rotundifolium*, nótese lóbulos (indicados con flechas). F. *C. venosum*, nótese estoma (indicado con flecha). G. *C. molle*, organización histológica en transcorte. H. *C. rotundifolium*, cristales en el parénquima (sección transversal). I. *C. molle*, irrigación vascular, indicada con flechas (sección longitudinal). ov: ovario; ei: epidermis interna; ee: epidermis externa. Barras: A = 150 μ m, B = 85 μ m, C-E = 100 μ m, F = 50 μ m, G, H = 30 μ m, I = 300 μ m.

Se observaron diferencias significativas en las dimensiones del pistilo entre las especies, siendo *C. rotundifolium* y *C. venosum* las especies con los pistilos más cortos, y *C. macrocarpum* la especie con el gineceo más largo (Tabla I). El estigma es terminal, lineal (Fig. 4A) y posee un área semiesférica. Las dimensiones de las áreas estigmáticas resultaron estadísticamente diferentes; el valor más bajo se presentó en el estigma de *C. rotundifolium* y el mayor en el de *C. macrocarpum*. La anchura del estigma fue la misma que tiene la porción más distal del estilo, encontrándose diferencias significativas al comparar las especies (Tabla I). El estigma más ancho se presenta en *C. macrocarpum*, donde además, se encuentra por debajo de las anteras, mientras que en el resto de las especies este se ubica por encima de las mismas. En los cinco taxones estudiados el estigma está revestido por papilas cortas y relativamente uniformes en su anchura (Figs. 4B y 4C), con contenido bastante denso (Fig. 4C), excepto en *C. brasilianum* donde son de mayor longitud en uno de sus lados; con cutícula ornamentada y exudado estigmático acumulado entre ellas (Figs. 4B y 4D). Inmediatamente debajo de la zona papilosa se localizan de 6-10 capas de células pequeñas, redondeadas, de contenido citoplasmático denso y paredes engrosadas (Figs. 4A y 4C). Las dimensiones del estilo fueron estadísticamente diferentes entre las especies estudiadas. El estilo más largo fue el de *C. macrocarpum*, mientras que *C. brasilianum* presentó el más corto. En las cinco especies el estilo es adelgazado en su parte basal, y en la porción media superior se curva y se comprime dorsiventralmente (Figs. 4B y 4E), adquiriendo forma de “J” invertida. El indumento estilar en los taxones bajo estudio está conformado por pocos tricomas, distribuidos a lo largo de esta estructura, localizados en la zona dorsal y ventral (Figs. 4E-4G). Dichos tricomas varían en longitud, son tectores unicelulares, aguzados hacia el ápice, y glandulares multicelulares. No obstante, en *C. brasilianum* la densidad de tricomas es mayor. Todas las especies tienen en la porción media-apical del lado ventral del estilo una acumulación de tricomas, en mayor o menor densidad (Fig. 4G). En la zona estigma-estilo, los tricomas son más largos y rodean al estigma (periestigmáticos); sin embargo, son más largos de un lado que del otro (Figs. 4D, 4H y 4I); dichos tricomas son erectos y su anchura varía desde la base hasta el ápice. En forma general, se puede señalar que, en transcurso, el estilo en las cinco especies posee forma elipsoidal, con un surco poco pronunciado en el lado ventral (Fig. 4J) y presenta epidermis uniestratificada con células subglobosas y cutícula ornamentada (Fig. 4K). Subepidérmicamente, se encuentra parénquima cortical formado por células de diferentes tamaños con paredes relativamente gruesas, mostrando un

arreglo bastante regular (Figs. 4J y 4K). El estilo es hueco en toda su extensión, ya que en su parte central presenta el canal estilar (Figs. 4J y 4L); las células adyacentes al canal son cuadrangulares a rectangulares en sección transversal, con paredes más gruesas que las del parénquima cortical y de contenido bastante denso (Fig. 4L); próximo al canal estilar y separado de este por células parenquimáticas, se encuentra el sistema vascular constituido por haces colaterales cerrados (Figs. 4J y 4L). Este sistema varía a lo largo del estilo, encontrándose haces separados por células parenquimáticas en la zona media inferior y, en la porción apical estilo-estigma varios haces conectados entre ellos, constituidos solo por células del floema. También se encontraron diferencias estadísticas significativas en las dimensiones del ovario entre las especies. Las células de ambas epidermis del carpelo son alargadas radialmente, con pared celular más cutícula levemente engrosada (Fig. 5A). La epidermis externa está revestida por varios tipos de tricomas: glandulares multicelulares, glandulares bicelulares y tectores bicelulares con ápice agudo (Figs. 3A-E, 5A y 5B); se observaron estomas en la epidermis externa. Seguidamente, se observó una matriz de parénquima con células globosas; inmersas en este tejido, se localizaron células de mayor tamaño que el resto, con inclusiones de naturaleza química desconocida (Figs. 5A y 5B). Los haces son colaterales cerrados se organizan en todo el carpelo, inmersos en la matriz de parénquima (Fig. 5A); los elementos de conducción del xilema presentan engrosamientos espiralados. El número de óvulos por ovario varía considerablemente de acuerdo a la especie (desde 7 hasta 24 óvulos), mostrando diferencias estadísticas significativas (Tabla I); así, *C. macrocarpum* presentó el mayor número de óvulos y *C. rotundifolium* el número más bajo.

La especie *C. macrocarpum* desarrolló los frutos más largos y *C. rotundifolium* los más cortos, pero en este caso más anchos. *C. brasilianum* presentó los más estrechos (Tabla I). El promedio de semillas producidas por fruto varió considerablemente de acuerdo a la especie, desde 6 hasta 17 (Tabla I). La especie que contiene mayor número de semillas por fruto es *C. macrocarpum*, mientras que la especie anficárpica *C. rotundifolium* posee el número más bajo.

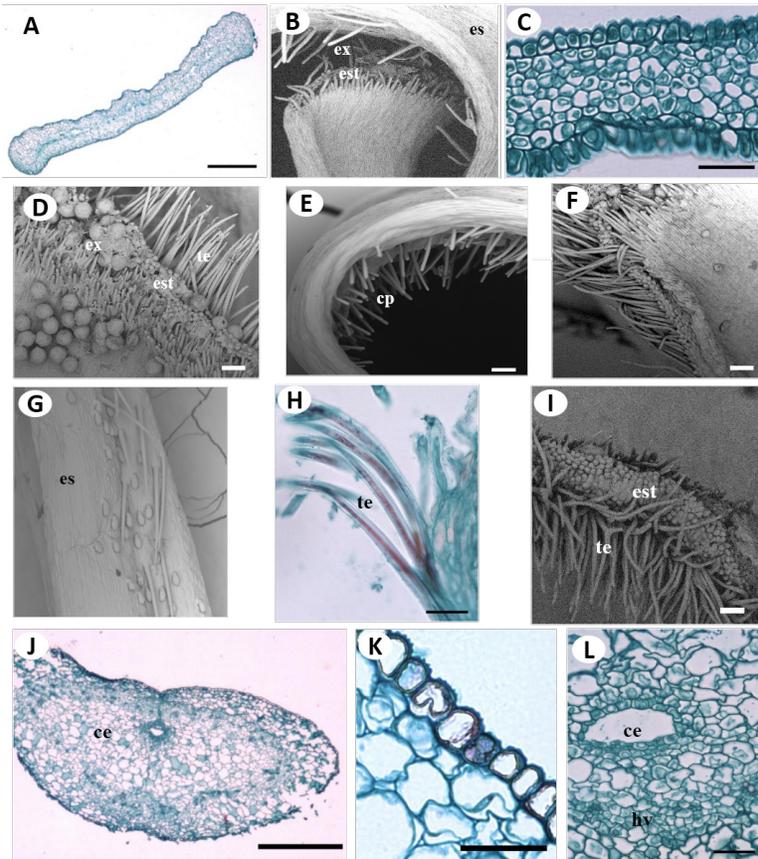


Fig. 4. Gineceo en especies de *Centrosema*. A, C, H, J-L. Fotomicrografías bajo microscopio óptico; B, D-G, I. Fotomicrografías en el microscopio de barrido. A. *C. molle*, vista general del estigma en sección transversal. B. *C. brasilianum*, vista general del estilo-estigma, nótese curvatura del estilo. C. *C. brasilianum*, detalle del estigma en sección transversal. D. *C. molle*, detalle de tricomas estilares próximos al estigma y granos de polen impregnados de exudado estigmático. E. *C. brasilianum*, nótese cepillo polínico. F. *C. molle*, tricomas estilares en límite estilo-estigma. G. *C. venosum*, tricomas glandulares y tectores en el lado ventral del estilo. H. *C. rotundifolium*, tricomas estilares. En sección longitudinal I. *C. macrocarpum*, superficie estigmática, nótese papilas y tricomas estilares. J. *C. molle*, vista general en transcorte del estilo. K. *C. macrocarpum*, detalle de la epidermis ornamentada del estilo en sección transversal. L. *C. rotundifolium*, detalle del canal estilar en sección transversal. ce: canal estilar; cp: cepillo polínico; es: estilo; est: estigma; ex: exudado; hv: haz vascular; te: tricoma estilar. Barras: A = 300 μm , B, E = 150 μm , C, H, K, L = 30 μm , D, F, G, I = 125 μm , J = 100 μm .

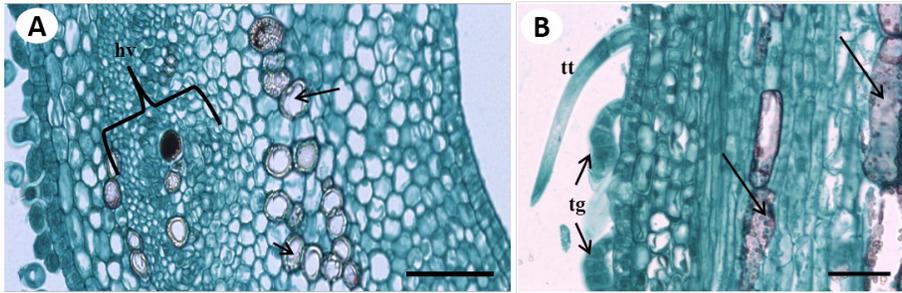


Fig. 5. Gineceo en especies de *Centrosema*. A. *C. macrocarpum*, carpelo en sección transversal, nótese estructuras secretoras (indicadas con flechas). B. *C. venosum*, sección longitudinal de la pared del ovario, nótese estructuras secretoras (indicadas con flechas). hv: haz vascular; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector. Barras: A y B = 30 µm.

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis muestra que los dos primeros componentes explican el 70% de la varianza total observada, el primero con 58% y el segundo con 12%; los coeficientes de las variables para definir cada componente están resumidos en el Tabla II, donde además se indican los caracteres con mayor aporte de información a cada componente.

Tabla II. Componentes principales y porcentaje de varianza explicada por cada uno para los caracteres morfológicos florales estudiados en las cinco especies de *Centrosema*.

Caracteres	Primer componente	Segundo Componente
Longitud del cáliz	-0.174	-0.347*
Ancho del cáliz	-0.239	-0.030
Longitud del estandarte	-0.242	0.279
Ancho del estandarte	-0.256	0.269
Longitud de las alas	-0.284*	-0.049
Ancho de las alas	-0.178	-0.257
Longitud de la quilla	-0.282	0.042
Ancho de la quilla	-0.288*	-0.029
Longitud del ovario	-0.291*	0.154
Díámetro del ovario	-0.130	-0.305*
Longitud del estilo	-0.135	-0.448*
Ancho del estilo	-0.176	-0.098

Tabla II. Continuación.

Caracteres	Primer componente	Segundo Componente
Ancho del estigma	-0.032	0.504*
Longitud del pistilo	-0.291*	-0.044
Longitud del tubo estaminal	-0.295*	-0.027
Diámetro del tubo estaminal	-0.229	0.216
Longitud de la antera	-0.287*	-0.070
Ancho de la antera	-0.236	0.150

* indica mayor aporte al componente

El análisis de los dos primeros componentes indica que la especie *C. macrocarpum* tiende a presentar valores altos en las variables con mayor peso dentro del primer componente: longitud de las alas, ancho de la quilla, longitud del tubo estaminal, longitud de la antera, longitud del ovario y longitud del pistilo, y las especies *C. rotundifolium* y *C. venosum* presentaron valores bajos, lo cual coincide con los resultados de los análisis de varianza; las especies restantes muestran un comportamiento intermedio (Fig. 6).

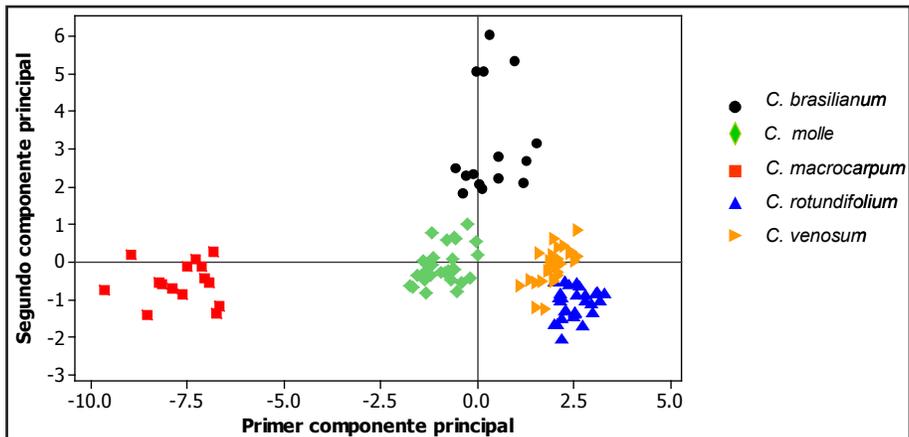


Fig. 6. Coordenadas factoriales para los individuos de las cinco especies de *Centrosema* en los dos primeros componentes principales.

En el segundo componente principal, las variables: longitud del cáliz, ancho del estigma, diámetro del ovario y longitud del estilo resultaron las más importantes para definirlo. En la Fig. 6 se observa que *C. brasilianum* se aleja del resto de las especies a lo largo del eje del segundo componente principal,

probablemente debido a que esta especie tiene los valores más bajos en las dimensiones de las variables seleccionadas, excepto en ancho de estigma que es similar al resto de las especies.

ASIGNACIÓN DE RECURSOS

Los valores de peso seco de las partes florales como estimadores de la inversión en reproducción y atracción, y las relaciones de biomasa entre ellas se muestran en la Tabla III. Las flores de *C. macrocarpum* fueron las más pesadas y las de *C. rotundifolium* las más livianas. En el peso seco promedio de cada uno de los verticilos de las cinco especies bajo estudio, se encontraron diferencias estadísticas significativas; *C. macrocarpum* es la especie con mayor biomasa en cada uno de sus verticilos con respecto al resto de los taxones. Particularmente, el peso seco promedio del cáliz fue similar en las especies *C. brasilianum*, *C. molle* y *C. rotundifolium*, registrando todas ellas la menor biomasa para este verticilo. En lo que respecta al resto de los verticilos (corola, androceo y gineceo), *C. rotundifolium* presentó el menor valor de peso seco promedio en cada uno de ellos. De acuerdo con los resultados, la fracción de biomasa asignada a cada verticilo floral fue mayor para la corola en todas las especies y menor para el gineceo. La relación biomasa reproductiva/biomasa vegetativa varió entre las especies. En la biomasa de estructuras reproductivas se encontró que el peso seco del androceo es aproximadamente tres veces mayor que el del gineceo para todos los taxones, lo que trae como resultado valores mayores de la relación biomasa masculina/biomasa femenina; esto indica que existe una mayor inversión masculina con relación a la inversión femenina. Las especies anficárpicas *C. rotundifolium* y *C. venosum* asignan menor biomasa al gineceo en comparación con el resto de las especies.

PRODUCCIÓN DE ÓVULOS, POLEN Y RELACIÓN POLEN/ÓVULO

El número de granos de polen por flor fue disímil entre las especies, encontrándose diferencias significativas entre ellas (Tabla III). *C. macrocarpum* presentó el mayor número de granos de polen por flor y *C. rotundifolium* el menor valor, mientras que las otras especies mostraron valores intermedios. Por otra parte, el número de óvulos por flor también varió significativamente entre las especies bajo estudio, siendo *C. rotundifolium* la especie con menor número de óvulos por flor. La relación P/O varió entre 1.358,79 para *C. molle* y 1.822,33 para *C. venosum* (Tabla III), destacando las especies anficárpicas, las cuales mostraron los valores mayores en esta relación. Según lo observado,

las especies no anficárpicas producen mayor número de óvulos por flor y de granos de polen por flor.

RELACIÓN SEMILLA/ÓVULO

El promedio de semillas producidas por fruto varió considerablemente entre las especies, encontrándose diferencias significativas entre las mismas (Tabla I). Los frutos de *C. macrocarpum* son los que contienen mayor número de semillas, mientras que los de *C. rotundifolium* registraron el menor número de semillas por fruto. Se observó una eficiencia reproductiva alta en la conversión de óvulos a semillas en las especies anficárpicas, mientras que en las otras especies esta relación fue menor (Tabla III).

Tabla III. Valores promedio de algunas variables asociadas a la reproducción sexual en las cinco especies estudiadas de *Centrosema*.

	<i>C. brasilianum</i>	<i>C. macrocarpum</i>	<i>C. molle</i>	<i>C. rotundifolium</i>	<i>C. venosum</i>
Flor	0,0351	0,0958	0,0427	0,0146	0,034
Biomasa seca					
Cáliz	0,0006 c (1,7)	0,0068 a (7,1)	0,0011 c (2,6)	0,0011 c (7,5)	0,0019 b (5,7)
Corola	0,0283 c (80,6)	0,0706 a (73,7)	0,0352 b (82,4)	0,0109 d (74,7)	0,0271 c (81,1)
Androceo	0,0042 b (12,0)	0,0138 a (14,4)	0,0046 b (10,8)	0,0021 d (14,4)	0,0031 c (9,3)
Gineceo	0,0020 b (5,7)	0,0046 a (4,8)	0,0018 b (4,2)	0,0005 d (3,4)	0,0013 c (3,9)
Relación de biomasa					
Masc/Fem	2,1	2,66	3,0	4,2	2,38
Repr/Veg	0,21	0,18	0,24	0,22	0,15
Producción promedio					
Polen/flor	27044,4 a	36155,6 b	21876,5 ab	11483,3 d	16947,7 c
Óvulo/Flor	18,8 b	24,0 a	16,1 c	6,6 e	9,3 d
Relación					
P/O	1440,1	1506,5	1358,8	1747,8	1822,3
S/O	0,68	0,68	0,75	0,83	0,93

Las mediciones de la biomasa seca están expresadas en mg. Especies con letras iguales no presentan diferencias significativas al 5%.

DISCUSIÓN

MORFOANATOMÍA FLORAL

Las flores son similares morfoanatómicamente en las cinco especies de *Centrosema* estudiadas. Se presentaron variaciones morfométricas entre ellas, encontrándose que, de una especie a otra, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las dimensiones de algunos de los verticilos florales. De acuerdo al análisis de componentes principales, la especie *C. macrocarpum* es la más fácil de distinguir, ya que las partes que constituyen la flor son más grandes que en el resto de las especies. Las flores de *C. venosum* y *C. rotundifolium* tienen mucha similitud y se caracterizan por ser pequeñas, mientras que las de *C. molle* y *C. brasilianum* tienden a presentar un tamaño intermedio; estas dos especies mostraron también dimensiones similares en el trabajo realizado por Ramalho *et al.* (2014) para la mayoría de las piezas del perianto, excepto para la quilla que resultó más grande en *C. molle*. El tamaño de las flores es uno de los rasgos considerados de atracción para algunos agentes polinizadores, particularmente para las abejas, ya que dependiendo del mismo pueden reconocerlas a determinada distancia (Baumann *et al.* 2007). En *Centrosema* se señalan como polinizadores efectivos u ocasionales varias especies de Hymenoptera-Apidae (Miles *et al.* 1997, Nogueira 2006, Cardel 2004, Ramalho *et al.* 2014, Álvarez 2019). Las flores de *C. pubescens* pueden ser consideradas como de tamaño intermedio en este trabajo (al observar la variación en este carácter), coincidiendo en parte con lo señalado por Álvarez (2019) quien las catalogó como medianas a grandes; este autor además señala como polinizador efectivo a *Xylocopa frontalis*, caracterizándolo como un polinizador grande. Los insectos se posan sobre el estandarte, por lo que este debe tener el tamaño y consistencia necesarios para poder soportarlos. Por otra parte, el tamaño de la quilla tiene relación con la profundidad que puede alcanzar la probóscide de las abejas para obtener el néctar; en relación a ello, Ramalho *et al.* (2014) indicaron que a las flores de *C. brasilianum* y *C. pubescens* llegan abejas medianas ($\geq 15 < 19,9$ mm) o grandes (≥ 20 mm), pudiendo recolectar fácilmente el néctar; sin embargo, abejas pequeñas (≤ 15 mm) no tienen acceso al mismo. Además, el tamaño de las flores ha sido señalado como un rasgo clave, que influye en la evolución y éxito del sistema reproductivo (Sargent *et al.* 2007). Se ha indicado que las flores que se autopolinizan tienden a tener dimensiones más pequeñas que aquellas que requieren polinización cruzada (Goodwillie *et al.* 2010). En las especies de *Centrosema*, se ha comprobado la formación de frutos por autopolinización

y polinización cruzada, por ejemplo, en *C. brasilianum* se ha indicado un 20% de autocompatibilidad y la existencia de porcentajes variables de entrecruzamiento dependiendo de las accesiones (Maas y Torres 1992); en *C. pubescens* también se ha comprobado (Nogueira 2006, Álvarez 2019) al igual que en *C. virginianum*; sin embargo, en esta especie los frutos provenientes de autopolinización produjeron menor cantidad de semillas, por lo que ha sido catalogada como parcialmente autocompatible (Cardel 2004). Además, se ha señalado que algunas especies requieren manipulación mecánica para que pueda ocurrir transferencia del polen al estigma. Dicha manipulación es efectuada en forma natural por polinizadores, lo cual ha sido referido en varias especies y particularmente en *C. macrocarpum* (Escobar 1991), taxón que resultó con las flores de mayores dimensiones, probablemente como una estrategia de atraer mayor número de polinizadores. Todos estos hallazgos hacen pensar en la necesidad de determinar la tasa de entrecruzamiento que tienen las especies bajo estudio en las condiciones donde crecen, y relacionarlo con la variación en tamaño que ocurre entre ellas, para establecer si existe o no una vinculación efectiva.

Anatómicamente, el cáliz en las especies de *Centrosema* estudiadas se caracteriza por la presencia de tricomas uncinados en la epidermis abaxial, rasgo adicional de protección, como ha sido indicado para las Papilionoidae por Tucker (1987). En *C. pascuorum* indican que este verticilo actúa como estructura de protección de la cámara de néctar (Amaral-Neto *et al.* 2015). La presencia de esculturaciones en las papilas de estandarte, así como células globosas en el margen del mismo han sido observadas por Drewes y Hoc (2000) en *Macroptilium fraternum* Juárez y S. Pérez. El desarrollo de papilas en las piezas de la corola, se ha comprobado que aumenta la tasa de visitas de polinizadores (Whitney *et al.* 2011), lo cual se debe a que dichas papilas incrementan la cantidad de luz absorbida por los pigmentos florales, mejorando el color que se percibe; pueden disipar mejor que las células planas, la luz reflejada desde el mesofilo, lo que resulta en un efecto brillante, y adicionalmente, pueden proporcionar señales táctiles que pueden ser percibidas por las antenas de los insectos (Kay *et al.* 1981). A las células globosas se les asigna naturaleza secretora; sin embargo, esto debe corroborarse para poder determinar, de acuerdo al tipo de secreción, una función particular, que quizás pudiese ser una recompensa adicional para los agentes polinizadores.

Las flores de las cinco especies de *Centrosema* consideradas en esta investigación, son muy similares en cuanto a la morfoanatomía del tubo

estaminal y de las anteras. La fusión de las piezas del androceo ha sido reportada como una ventaja adaptativa en el fortalecimiento de la flor al restringir el grupo de polinizadores que pueden visitar las flores (Tucker 1987); asimismo, la presencia de un estambre libre facilita a los insectos el acceso al nectario ubicado entre androceo y gineceo (Tucker 2003). Las anteras son tetrasporangiadas siendo todas fértiles. El endotecio en todas las especies es uniestratificado, aunque se han reportado varias capas de este en otras leguminosas (Prakash 1987). Es interesante destacar que las anteras presentan una epidermis marcadamente papilosa en el punto de unión de la antera al filamento, las cuales tienen en su interior cuerpos globosos no identificados, al igual que el tejido parenquimático del conectivo; es necesario definir la naturaleza química de los mismos a fin de determinar su función. Los patrones de engrosamiento del endotecio son útiles taxonómicamente a nivel de familia y de géneros; no obstante, no se presentan variaciones importantes entre especies relacionadas (Manning 1996), lo cual parece ser cierto para *Centrosema*, ya que no se encontraron diferencias entre las especies con relación a este aspecto. Aunque en casi la mitad de Papilionoideae las células del tapete presentan cristales de oxalato de calcio (Prakash 1987), esto no se observó en ninguna de las especies bajo estudio.

En las especies de *Centrosema* estudiadas el estigma es lineal, lo que se ha señalado para otras leguminosas (Gunn y Kluge 1976) y se encuentra ubicado ligeramente por encima de las anteras en todas las especies (hercogamia de aproximación), excepto en *C. macrocarpum*, donde queda por debajo (hercogamia reversa); esto último también fue observado en *C. pascuorum* (Amaral-Neto *et al.* 2015). La evolución ha hecho que la mayoría de las angiospermas presente hercogamia de aproximación, lo cual asegura el contacto primero del estigma con el cuerpo del polinizador cuando este entra a la flor en busca de polen o néctar, a la vez que evita la interferencia entre los órganos sexuales de la flor y por tanto promueve la polinización cruzada. La hercogamia reversa es menos frecuente, aunque también evita la interferencia entre los órganos sexuales de la flor (Fernández-Cardoso *et al.* 2018, Simón-Porcar 2018). La separación vertical antera-estigma en las especies estudiadas probablemente es una vía para restringir en algunos de sus individuos la autopolinización. Sin embargo, dentro de las poblaciones de cada una de las especies existen flores sin hercogamia, lo cual debe interferir con las tasas de cruzamiento. El estigma de las especies de *Centrosema* pudiese considerarse semiseco, atendiendo a la clasificación propuesta por

Bortolin-Costa *et al.* (2014) quienes indican que en este tipo de estigma hay un exudado contenido por una capa, denominada membrana o cutícula estigmática y ha sido observada en *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L., *Cilianthus puniceus* L., *Vigna caracalla* L., entre otros taxones (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison 1983, Heenan 1998, Etcheverry *et al.* 2008). No obstante, en algunas especies de leguminosas como *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Ghosh y Shivanna 1982), *Crotalaria micans* Link (Etcheverry *et al.* 2003), *Macroptilium* (Benth.) Urb. (Drewes 2005) y *Crotalaria retusa* L. (Jacobi *et al.* 2005), dicha membrana está ausente. Esa cutícula puede constituir un mecanismo de protección contra la desecación del exudado estigmático o de las células que lo producen, sobre todo en ambientes abiertos y secos (Bortolin-Costa *et al.* 2014). Además, se ha reportado que constituye una barrera para la autopolinización e influye en la polinización cruzada (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison 1983, Heenan 1998, Bortolin-Costa *et al.* 2014). Los altos niveles de entrecruzamiento en las leguminosas se ven favorecidos por un mecanismo denominado “tripping”, el cual puede ocurrir espontáneamente o ser provocado por un agente polinizador; dicho mecanismo provoca la ruptura de la cutícula estigmática, con la consecuente liberación de sustancias que facilitan la adherencia del polen sobre el estigma y estimulan la germinación del mismo (Arroyo 1981). Se ha indicado que esta es una forma mecánica de favorecer la polinización cruzada en especies autocompatibles (Speroni e Izaguirre 2003). En *Centrosema* parece ser un mecanismo común en sus especies, ya que al presente ha sido confirmado en *C. macrocarpum* (Escobar 1991, Schultze-Kraft 1992) y en *C. pubescens* (Nogueira 2006).

La superficie estigmática se encuentra limitada por abundantes tricomas que surgen en el extremo distal del estilo (tricomas estilares), pudiendo considerárseles tricomas periestigmáticos; en este último caso estos podrían evitar la llegada del polen propio al estigma de la flor, como ha sido reportado por Drewes (2005) en *Macroptilium*, Etcheverry *et al.* (2008) en *Vigna caracalla* L. y Bortolin-Costa *et al.* (2014) en un número importante de otras leguminosas. Los tricomas presentes en la zona apical del estilo de las flores aéreas en posición introrsa pueden corresponder con lo que Lavin y Delgado (1990) denominan “polen brush” o “cepillo polínico”; su presencia ha sido referida también en *C. pascuorum* (Amaral-Neto *et al.* 2015); estos tricomas probablemente participan en la presentación secundaria del polen, mayormente cuando las anteras se encuentran ligeramente por encima del gineceo (Lavin y Delgado 1990) como ocurre en *C. macrocarpum*. Se ha reportado la presencia

de cepillo polínico en flores aéreas de Papilionoideae, entre ellas: *Vigna minima* (Roxb.) Ohwi y Ohashi (Gopinathan y Babu 1987), *Macroptilium* (Etcheverry *et al.* 1999, Drewes 2005), *V. caracalla* L. (Etcheverry *et al.* 2008) y diferentes especies de *Vigna* Savi (Drewes y Gamba 2011). Es de destacar que también se ha observado en flores cleistógamas y casmogámas de *Coursetia caribaea* (Jacq.) Lavin (Lavin y Delgado 1990). El estilo se presenta curvado y aplanado, adoptando forma de “J” invertida; esta curvatura puede favorecer el contacto antera-estigma cuando ambas estructuras permanecen dentro de la quilla, ya que están muy próximas, pero puede facilitar la polinización cruzada una vez han sido expulsadas de la quilla, al permitir un mejor contacto con los polinizadores. En relación a ello, Goodwillie y Weber (2018) indicaron que los cambios en los órganos reproductivos se producen de diversas maneras para disminuir la autopolinización. Anatómicamente, el estilo es bastante similar al de otras Leguminosae (Gohs y Shivanna 1982), no mostrando características especiales. Es hueco como ha sido referido para varios miembros de las Papilionoideae (Heslop-Harrison y Shivanna 1977, Gohs y Shivanna 1982), y se puede considerar ciliado debido a que los tricomas del ovario sobrepasan la base del estilo, tal como Lavin y Delgado (1990) lo han descrito para *C. virginianum*, pero con estigma penicilado.

La anatomía del ovario es semejante a la de otras leguminosas. Destaca la presencia de tricomas glandulares y tectores, los cuales son semejantes a dos de los tipos caracterizados en *Glycine max* por Healy *et al.* (2005, 2009), quienes analizaron la ultraestructura de los mismos, indicando que los glandulares pudiesen producir compuestos volátiles que podrían actuar en evitar la acción de microbios e insectos, ejerciendo una función de protección tanto al gineceo como al nectario. Asimismo, es evidente en esta porción del gineceo así como en el conectivo de la antera, la presencia de inclusiones de naturaleza química desconocida que pudiesen ser compuestos fenólicos, los cuales pueden actuar, así como en cualquier otro órgano de la planta, como defensa química ante herbívoros que comen flores. Soper y Adler (2016) indican que estos compuestos muchas veces están presentes en las flores, e inclusive en mayor proporción que en las hojas, pero que es un tema poco estudiado. Con esta afirmación concuerdan Cury de Barros *et al.* (2017), quienes señalan, además, que más allá de secreciones vinculadas a la polinización, en las flores se producen diversos compuestos que juegan un papel importante en la protección.

Las características anatómicas del nectario coinciden con el tipo más común referido en las papilionoideas (Lewis *et al.* 2005). La suplencia vascular solo por cordones floemáticos pudiese asociarse a néctar con alto contenido de azúcares, como fue señalado por Frey-Wyssling (1955). La presencia de dos tipos de nectarios florales, uno con margen liso y otro con margen lobulado, así como el reporte de Lopes-Barreto *et al.* (2018) en *C. sericiflorum*, especie endémica de la Caatinga de Bahia, Brasil, de siete lóbulos en su nectario, hace pensar en la necesidad de explorar con más detalle este carácter para validar su valor diagnóstico y a fin de relacionarlo con la biología reproductiva de las especies. Se ha indicado que en *Vicia* se presentan tres tipos diferentes de nectarios florales, los cuales varían en la existencia o no de proyecciones y en el tamaño del disco nectarífero (Heneidak y Hassan 2007). La presencia de estomas en el borde superior del nectario de *C. venosum* hace pensar que posiblemente estos participen en la secreción, comportándose como nectaroestomas; en los otros casos es posible que ocurra por ruptura de la cutícula. Los tricomas observados en la cara interna del nectario en *C. molle* quizás sean de valor taxonómico. Un carácter llamativo en el mismo fue la presencia de cristales. Horner *et al.* (2003) reportan estas estructuras en una de las fases del nectario degenerativo de *G. max*, indicando que cuando tales sustancias ergásticas se ubican en una zona específica del mismo, pueden reducir el movimiento de iones calcio hacia este y que altas proporciones pueden inhibir el mecanismo de secreción.

ASPECTOS REPRODUCTIVOS

Los modelos de asignación sexual suponen que los recursos para la reproducción son finitos, predeterminados al comienzo de la estación reproductiva, y que deben ser distribuidos entre las funciones masculina, femenina y de atracción (Brunet 1992).

En las cinco especies de *Centrosema* estudiadas, la asignación de biomasa floral a las distintas funciones apoya la posibilidad de que una parte de la descendencia se produzca vía entrecruzamiento. Los modelos evolutivos sobre la asignación de recursos en plantas predicen la disminución de biomasa masculina y perianto, principalmente, en la medida que aumenta la seguridad de la transferencia del polen, es decir, desde plantas xenógamas obligadas hasta plantas altamente autóгамas (Schöen 1982). La asignación de biomasa tanto a la función de atracción como a la masculina en las especies analizadas fue considerable, lo que evidencia la necesidad de estas plantas de poseer

suficientes mecanismos de atracción y recompensa para los polinizadores como una manera de asegurar la variabilidad genética. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el índice P/O, donde estas plantas se comportan como xenógamas facultativas. Un comportamiento semejante fue observado por Etcheverry *et al.* (2003) en especies de *Crotalaria* y también por Villalobos y Ramírez (2010) en *Crotalaria micans* Link. Es probable que la posibilidad de producir frutos por autopolinización y polinización cruzada, sea consecuencia de la historia de vida de esas especies y de su capacidad para sobrevivir en ambientes perturbados, tal como ha sido encontrado en otros taxones (Etcheverry *et al.* 2003, Villalobos y Ramírez 2010).

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. En *Centrosema* los valores de la relación polen/óvulo se corresponden con los de plantas xenógamas facultativas de acuerdo al criterio de Cruden (1977). Cardel (2004) señala una relación polen/óvulo de 187 ± 19 para *C. virginianum*. Arroyo (1981) se refiere a *Centrosema* como un género autocompatible con mecanismos que promueven la polinización cruzada. Lloyd y Schöen (1992) indicaron que en familias con mecanismos especializados de polinización, como Leguminosae-Papilionoideae, la selección natural tiende a promover el entrecruzamiento; *Vigna caracalla* L. es un ejemplo de esto (Etcheverry *et al.* 2008). *C. macrocarpum*, *C. pubescens* (Nogueira 2006, Álvarez 2019) han sido consideradas como xenógamas facultativas (Escobar 1991), mientras que *C. virginianum* fue catalogada como parcialmente autocompatible (Cardel 2004). Etcheverry *et al.* (2012), trabajando con 21 especies de leguminosas argentinas, encontraron un efecto del mecanismo de polinización y de la recompensa sobre la relación polen óvulo; señalaron que las especies que ofrecen solo néctar como recompensa tienen como mecanismo de polinización el cepillo polínico, y en ellas se observaron los valores más bajos de la relación polen/óvulo. Los taxones de *Centrosema* estudiados comparten esas características y presentan valores relativamente bajos en dicha relación. Las relaciones de biomasa y polen/óvulo indican que en las especies del género estudiado hay un sistema mixto de reproducción, coincidiendo con lo señalado por Penteadó *et al.* (1996) para *C. acutifolium*, *C. brasilianum* y *C. pubescens*, quienes consideran que eso debe tenerse en cuenta al recolectar, multiplicar y conservar los recursos genéticos de estas especies.

El número de semillas encontrado para *C. brasilianum*, *C. molle* y *C. macrocarpum* coincide con el señalado por Razz y Faría (1996) para estas especies. La relación semilla/óvulo es relativamente alta en los taxones citados, ya que alrededor del 70% de los óvulos en el ovario son fertilizados y producen semillas. Pero en las especies anficárpicas la eficiencia fue mayor (83-93%). En el caso de *C. brasilianum* se reportaron valores de 68% en frutos provenientes de autopolinización y 73% en los que se formaron por polinización cruzada (Torres y Maass 1992).

Las flores de *C. macrocarpum* destacan por sus mayores dimensiones y las especies anficárpicas por tener las flores más pequeñas; probablemente la variación en tamaño está vinculada con las tasas de entrecruzamiento en las cinco especies y con los insectos polinizadores asociados a cada una. La caracterización anatómica de los verticilos florales ofrece algunas características importantes de revisar para verificar su valor diagnóstico, tales como las lobulaciones del nectario, la presencia de tricomas y estomas en esta estructura, las dimensiones de las papilas del estandarte, entre otras. Se observaron varias características estructurales del gineceo que posiblemente puedan favorecer la polinización cruzada; entre ellas: 1) cutícula estigmática, la cual evitaría la autopolinización y en consecuencia requeriría del *tripping* para una polinización efectiva; 2) tricomas periestigmáticos, los cuales pueden prevenir la deposición del polen propio sobre el estigma; 3) hercogamia, la cual puede favorecer que el polen quede atrapado en el cepillo polínico; 4) nectario, el cual puede ofrecer recompensa a los polinizadores. Por otra parte, las especies se comportan como xenógamas facultativas con una producción de semillas por fruto relativamente alta.

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

- Álvarez, C. 2019. Ecología de polinización de *Centrosema pubescens* (Fabaceae) en un bosque seco de Anapoima, Cundinamarca. Trabajo de grado. Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia. 39 p.
- Amaral-Neto, L.P., Ch. Westerkamp and G. Melo. 2015. From keel to inverted keel flowers: functional morphology of “upside down” papilionoid flowers and the behavior of their bee visitors. *Plant Syst. Evol.* 301: 2161-2178.
- Arroyo, M.T.K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. *In: Polhill, R.M. and P.H. Raven (Eds.). Advances in legume systematics. Part 2: 723-769. Royal Botanical Gardens, Kew. 1050 p.*
- Aymard, G. y P.R. Fantz. 2008. *Centrosema*. *In: Hokche, O., P.E. Berry y O. Huber (Eds.). Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela. 380-400. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela. 859 p.*
- Barbosa-Fevereiro, V.P. 1977. *Centrosema* (A.P. De Candolle) Bentham do Brasil (Leguminosae-Faboideae). *Rodriguésia* 29: 159-219.
- Basso-Alves, J.P., K. Agostini and S. de Pádua Teixeira. 2011. Pollen and stigma morphology of some Phaseoleae species (Leguminosae) with different pollinators. *Plant Biol.* 13: 602-610.
- Bauman, K., M. Perez-Rodriguez, D. Bradley, J. Venail, P. Bailey, H. Jin, R. Koes, K. Roberts and C. Martin. 2007. Control of cell and petal morphogenesis by R2R3 MYB transcription factors. *Development* 134: 1691-1701.
- 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.
- Bortolin-Costa, M.F., J. Villela-Paulino, C. Ribeiro-Marinho, V. Gonçalves-Leite, G. Donizete-Pedersoli and S. Pádua-Teixeira. 2014. Stigma diversity in tropical legumes with considerations on stigma classification. *Bot. Rev.* 80: 1-29.
- Brunet, J. 1992. Sex allocation in hermaphroditic plants. *Tree* 7: 79-84.

- Cardel, Y. 2004. Linking herbivory and pollination: costs and selection implications in *Centrosema virginianum* Bentham (Fabaceae: Papilionoideae). Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Biology. Florida International University. Miami, United States. 105 p.
- Crisci, J.V. y M.F. López. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Organización de Estados Americanos. Washington D.C., United States. 132 p.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding system in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Cury de Barros, T., C. Ribeiro-Marinho, G. Donizete-Pedersoli, J. Vilella-Paulino and S. Pádua-Teixeira. 2017. 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 *Macroptilium* (Fabaceae). *Kurtziana* 31: 29-38.
- Drewes, S.I. y C. Gamba. 2011. Morfología profunda del gineceo en *Vigna* (Leguminosae, Papilionoideae). *Kurtziana* 36: 55-67.
- Drewes, S.I. y P.S. Hoc. 2000. Morfología y desarrollo de flores cleistógamas en *Macroptilium fraternum* (Fabaceae). *Kurtziana* 28: 229-238.
- Escobar, G. 1991. Aspectos coevolutivos en la polinización de plantas por insectos: polinización de *Centrosema macrocarpum*, un caso práctico. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad del Valle. Cali, Colombia. 111 p.
- Etcheverry, A.V., J.J. Protomastro and C. Westerkamp. 2003. Delayed autonomous self-pollination in the colonizer *Crotalaria micans* (Fabaceae: Papilionoideae): structural and functional aspects. *Pl. Syst. Evol.* 239: 15-28.
- Etcheverry, A.V., M.M. Alemán and T. Figueroa-Fleming. 2008. Flower morphology, pollination biology and mating system of the complex flower of *Vigna caracalla* (Fabaceae: Papilionoideae). *Ann. Bot.* 102: 305-316.
- Etcheverry, A.V., M.M. Alemán, T. Figueroa-Fleming, D. López-Spahr, C.A. Gómez, C. Yáñez, D.M. Figueroa-Castro y P. Ortega-Baes.

2012. Pollen:ovule ratio and its relationship with other floral traits in Papilionoideae (Leguminosae): an evaluation with Argentine species. *Plant Biol.* 14: 171-178.
- Etcheverry, A.V., S.M. Perez de Bianchi, D. Martin de Lopez and J.J. Protomastro. 1999. Floral biology of *Macropodium erythroloma* (Benth.) Urban (Phaseolae, Papilionoideae, Fabaceae). *Beitr. Biol. Pflanz.* 71: 403-418.
- Eynard, C. y L. Galetto. 1999. Estructura floral y variabilidad intraespecífica de *Geoffroea decorticans* (Fabaceae). *Darwiniana* 37: 219-228.
- Fantz, P. 1999. *Centrosema*. In: Steyermark, J., P. Berry, K. Yatskievich and B. Holst (Eds.). *Flora of the Venezuelan Guayana* 5: 271-276. Missouri Botanical Garden Press. St Louis, United States. 833 p.
- Fariñas, J. 2000. *Centrosema* en Venezuela. I Morfología y taxonomía. I Simposium Nacional: Experiencias con el género *Centrosema* en Venezuela. Universidad de Hohenheim e Instituto de Investigaciones Agrícolas. El Tigre, Anzoátegui, Venezuela.
- Fernandes-Cardoso, J.C., M. Lacerda-Viana, R. Matias, M. Furtado, A.P. de Souza Caetano, H. Consolaro and V.L. Garcia de Brito. 2018. Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Bot. Bras.* 32: 329-348.
- Flores, A.J. y R. Schultze-Kraft. 1994. Recolección de recursos genéticos de leguminosas forrajeras tropicales en Venezuela. *Agron. Trop.* 44: 357-371.
- Frey-Wyssling, A. 1955. The phloem supply to the nectaries. *Acta Bot. Neerl.* 4: 358-369.
- Goodwillie, C., R. Sargent, C.G. Eckert, E. Elle, M. Geber, M.O. Johnston, S. Kalisz, D.A. Moeller, R.H. Ree, M. Vallejo-Marin and A.A. Winn. 2010. Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytol.* 185: 311-321.
- Goodwillie, C. and J.J. Weber. 2018. The best of both worlds? A review of delayed selfing in flowering plants. *Am. J. Bot.* 105: 641-655.
- Gohs, 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. Kluge. 1976. Androecium and pistil characters for tribe Vicieae (Fabaceae). *Taxon* 25: 563-575.
- Healy, R.A., H.T. Horner, T.B. Bailey and R.G. Palmer. 2005. A microscopic study of trichomes on gynoecia of normal and tetraploid Clark cultivars of *Glycine max* and seven near-isogenic lines. *Int. J. Plant Sci.* 166:415-425.
- Healy, R.A., R.G. Palmer and H.T. Horner. 2009. Multicellular secretory trichome development on soybean and related *Glycine* gynoecia. *Int. J. Plant Sci.* 170: 444-456.
- Heenan, P.B. 1998. The pollination system and stigmatic cuticle of *Clianthus puniceus* (Fabaceae). *New Zealand J. Bot.* 36: 311-314.
- Heneidak, S. and A.E. Hassan, 2007. Morphological and anatomical studies of floral and extrafloral nectaries in some *Vicia* taxa (Fabaceae). *Int. J. Bot.* 3: 329-341.
- Heslop-Harrison, J. and Y. Heslop-Harrison. 1983. Pollen-stigma interactions in the leguminosae: the organization of the stigma in *Trifolium pratense* L. *Ann. Bot.* 51: 571-583.
- Heslop-Harrison, Y. and K. Shivanna. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41: 1.233-1.258.
- Horner, H.T., R.A. Healy, T. Cervantes-Martinez and R.G. Palmer. 2003. Floral nectary fine structure and development in *Glycine max* L. (Fabaceae). *Int. J. Plant Sci.* 164: 675-690.
- Jacobi, C., M. Ramalho and M. Silva. 2005. Pollination biology of the exotic rattleweed *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae) in NE Brazil. *Biotropica* 37: 357-363.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw Hill Book Company, Inc. New York, United States. 523 p.
- Kay, Q., H. S. Daoud and C. H. Stirton. 1981. Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. *Bot. J. Linn. Soc.* 83: 57-84.

- Lamire, M.J., J.D. Caulan, D.R. Anolin and A.G. Castillo. 2019. Chicken fed with *Centrosema* (*Centrosema pubescens* L.) leaf meal. *EJFood* 1: 1-6.
- Lavin, M. and A. Delgado. 1990. Pollen brush of Papilionoideae (Leguminosae): morphological variation and systematic utility. *Am. J. Bot.* 77: 1294-1312.
- Lewis, G.P., B. Schrire, B. Mackinder and M. Lock. 2005. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens. Kew, England. 557 p.
- Lloyd, D.G. 1965. Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contrib. Gray Herb. Harvard Univ.* 195: 3-134.
- Lloyd, D.G and D.J. Schöen. 1992. Self-versus cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions of self and cross-fertilization. *Int. J. Plant Sci.* 153: 370-380.
- Lopes-Barreto, K., C. Snak, C. Silva and L. Paganucci de Queiroz. 2018. *Centrosema sericiflorum* (Leguminosae, Papilionoideae), a new species endemic to the Caatinga of Bahia, Brazil, and a key to the Bahian species of the genus. *Syst. Bot.* 43: 980-985.
- Maass, B. and A.M. Torres. 1992. Outcrossing in the tropical forage legume *Centrosema brasilianum* (L.) Benth. *Proc. XIIIth Eucarpia Congress.* Angers, France.
- Manning, J. 1996. Diversity of endothecial patterns on the angiosperms. D'Arcy, W. and R. Keating (Eds.). *The anther. Form, function and phylogeny.* 136-158. Cambridge University Press. New York, United States. 335 p.
- Miles, J.W., R.J. Clements, B. Grof y A. Serpa. 1997. Genética y mejoramiento de *Centrosema*. In: Schultze-Kraft, R., R.J. Clements and G. Keller Grein (Eds.). *Centrosema: biología, agronomía y utilización.* 283-313. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 765 p.
- 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.
- Nogueira, H.B. 2006. Biología reproductiva de *Centrosema pubescens* Benth. (Fabaceae). *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi. Ciênc. Nat.* 1: 31-38.

- Nworgu, F.C. 2015. *Centrosema* (***Centrosema pubescens***) leaf meal as a protein supplement for broiler chicks production. *J. Exp. Biol. Agric.* 3: 440-447.
- Oladimeji, H.O., R. Nia and E. Oforah. 2007. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of ***Centrosema plumieri*** Benth. (Leguminosae-Papilionaceae). *J. Pharm. Toxicol.* 2: 580-585.
- Penteado, M.I., L.E. Sáenz de Miera and M. Pérez de la Vega. 1996. Genetic resources of ***Centrosema*** spp.: genetic changes associated to the handling of an active collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 43: 85-90.
- Prakash, N. 1987. Embriology of the leguminosae. *In*: C.H. Stirton (Ed.). *Advances in legume systematics. Part 3*: 241-262. Royal Botanic Gardens. Kew, England. 480 p.
- Prenner, G. 2004. The asymmetric androecium in Papilionoideae (Leguminosae): definition, occurrence, and possible systematic value. *Int. J. Pl. Sci.* 165: 499-510.
- Ramalho, M., M. Silva and G. Carvalho. 2014. Pollinator sharing in specialized bee pollination systems: a test with the synchronopatric lip flowers of ***Centrosema*** Benth. (Fabaceae). *Sociobiology* 61: 189-197.
- Ramírez, N. 1992. Las características de las estructuras reproductivas, niveles de aborto y semillas producidas. *Acta Ci. Venez.* 43: 167-177.
- Razz, R. y N. Faría. 1996. Características botánicas de especies de ***Centrosema*** (L.) Benth. *Rev. Fac. Agron. LUZ* 13: 233-538.
- Rodríguez, I., R. Schultze-Fraft y S. González. 2000. Adaptabilidad de 6 accesiones de ***Centrosema rotundifolium*** a las condiciones de suelo ácido de la Mesa de Guanipa. I Simposium Nacional: Experiencias con el género ***Centrosema*** en Venezuela. Universidad de Hohenheim-Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). El Tigre, Anzoátegui, Venezuela.
- Sakai, W. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technol.* 48: 247-249.
- Sargent, R., C. Goodwillie, S. Kalisz and R. Ree. 2007. Phylogenetic evidence for a flower size and number trade-off. *Am. J. Bot.* 94: 2.059-2.062.
- Schöen, D.J. 1982. Male reproductive effort and breeding system in a hermaphroditic plant. *Oecologia* 53: 255-257.

- Schultze-Kraft, R. 1992. *Centrosema macrocarpum* Benth. In: Marnettje, L. 't and R.M. Jones (Eds.). Plant resources of South-East Asia No. 4. Forages. 82-84. Pudoc Scientific Publishers. Wageningen, the Netherlands, Holland. 301 p.
- 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. Harlow, U.K. 496 p.
- Schultze-Kraft, R., G. Keller-Grein, E. Cardenas and F. Diaz-Bolívar. 1994. Potencial de *Centrosema rotundifolium* como leguminosa forrajera. Forrajes Trop. 16: 2-8.
- 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.
- Simón-Porcar, V., M. Abdelaziz y J. Arroyo. 2018. El papel de los polinizadores en la evolución floral: una perspectiva mediterránea. Ecosistemas 27: 70-80.
- Soper, N.L. and L.S. Adler. 2016. Florivory shapes both leaf and floral interactions. Ecosphere 7: e01326.
- Speroni, G. y P. Izaguirre. 2003. Características biológicas de la leguminosa promisoría forrajera *Trifolium polymorpha* Poir. Agrobiencia 7: 68-76.
- Stirton, C.H. 1981. Petal sculpturing in papilionoid legumes. In: Polhill, R.M. and P.H. Raven (Eds.). Advances in legume systematics. Part 2: 771-788. Royal Botanical Gardens. Kew, England. 1049 p.
- Tandon, R., K.R. Shivanna and H.Y. Mohan-Ram. 2003. Reproductive biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). Ann. Bot. 92: 1-9.
- Torres, A.M. y B.L. Maass. 1992. Biología reproductiva y entrecruzamiento de *Centrosema brasilianum* (L.) Benth. XIII Reunión de la Asociación Colombiana de Herbarios. Cartagena de Indias, Colombia.

- 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.
- Tucker, S.C. 2003. Floral development in legumes. *Plant Physiol.* 131: 911-926.
- Villalobos, S. y N. Ramírez. 2010. Biología reproductiva de *Crotalaria micans* Link (Fabaceae): especie colonizadora de amplia distribución geográfica. *Acta Bot. Venez.* 33: 67-81.
- Weryszko-Chmielewska, E., M. Masierowska and A. Sulborska. 2001. Flowering biology, structure of nectarines and nectar production in two *Dictamnus albus* L. cultivars. *Acta Hortic.* 56: 131-135.
- Whitney, H.M., R. Poetes, U. Steiner, L. Chittka and B.J. Glover. 2011. Determining the contribution of epidermal cell shape to petal wettability using isogenic *Antirrhinum* lines. *PLoS One* 6: e17576.
- 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 agricultura. *Biol. Rev.* 2020: 1-25.