



CARACTERIZACIÓN DE SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE *ZEPHYRANTHES BIFIDA* (AMARYLLIDACEAE)

CHARACTERIZATION OF SEEDS AND SEEDLINGS OF *ZEPHYRANTHES BIFIDA* (AMARYLLIDACEAE)

Juan M. Goyenetche^{1,2}, María C. Acosta¹, M. Luciana Alcaraz¹, Vilma T. Manfreda¹ & Rosa L. Scaramuzzino^{1*}

1. Núcleo de Estudios Vegetacionales y Agroecológicos de Azul (NUCEVA), Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

2. Becario "Estímulo a las Vocaciones Científicas", Consejo Interuniversitario Nacional.

*rosas@faa.unicen.edu.ar

Citar este artículo

GOYENETCHE, J. M., M. C. ACOSTA, M. L. ALCARAZ, V. T. MANFREDA & R. L. SCARAMUZZINO. 2022. Caracterización de semillas y plántulas de *Zephyranthes bifida* (Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 57: 711-725.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v57.n4.37812>

Recibido: 7 Jun 2022
Aceptado: 8 Sep 2022
Publicado en línea: 4 Nov 2022
Publicado impreso: 30 Dic 2022
Editora: Ana María González 

ISSN versión impresa 0373-580X
ISSN versión on-line 1851-2372

SUMMARY

Background and aims: *Zephyranthes bifida* is a native species of the Pampas ecoregion, with ornamental and medicinal potential. In this work, the seedling was studied for the first time and its seeds were characterized. The objectives were to describe the cotyledon and the first leaf and to provide some anatomical characteristics, as well as to provide information about the embryo/endosperm relationship and the type of reserve substances in the seed.

M&M: Seed reserve substances were determined by histochemical tests and the embryo/endosperm surface ratio was obtained with ImageJ. In seedlings, morphological structures were described, using Tillich's terminology (1995; 2007), and some anatomical characteristics. Phenological stages were established for ten days from germination.

Results and conclusions: Lipid and protein and lack of starch were determined in embryo and endosperm. In seedlings, the cotyledon is subdivided into a hypophyll and a hyperphyll. Hypophyll presents a ring through which the first eophyll emerges. The distal part of the cotyledonary hyperphyll is completely inserted in the seed, has a haustorial function and has two vascular bundles. Proximal part of cotyledonary hyperphyll has photosynthetic activity and has two vascular bundles too. In the first eophyll, hyperphyll has three vascular bundles. The primary root is attached to the base of the cotyledon through a very short hypocotyl, which in its basal part has rhizoids. Four stages were defined during germination from the emergence of hypophyll, hyperphyll and first eophyll.

KEY WORDS

Anatomy, cotyledon, eophyll, *Rhodophiala bifida*; seedlings, seed reserves, seeds.

RESUMEN

Introducción y objetivos: *Zephyranthes bifida* es una especie nativa de la ecorregión pampeana, con potencial ornamental y medicinal. En este trabajo se estudió por primera vez la plántula y se caracterizaron sus semillas. Los objetivos fueron describir el cotiledón y la primera hoja, aportar algunas características anatómicas, y brindar información acerca de la relación embrión/endosperma y del tipo de sustancias de reserva de la semilla.

M&M: Mediante pruebas histoquímicas se determinaron sustancias de reserva seminales y con ImageJ se obtuvo la relación de superficie embrión/endosperma. En plántulas se describieron estructuras anatómicas y morfológicas utilizando la terminología de Tillich (1995; 2007). Se establecieron estados fenológicos durante diez días desde la germinación.

Resultados y conclusiones: Se determinó la presencia de lípidos y proteínas y la ausencia de almidón en embrión y endosperma. En la plántula, el cotiledón está formado por un hipófilo y un hiperfilo. El hipófilo presenta un anillo por el cual emerge el primer eófilo. El extremo distal del hiperfilo cotiledonar está inserto completamente en la semilla, tiene función haustorial y posee dos haces vasculares. La zona proximal del hiperfilo cotiledonar tiene actividad fotosintética y también presenta dos haces vasculares. El hiperfilo del primer eófilo posee tres haces vasculares. La raíz primaria está unida a la base del cotiledón a través de un hipocótilo muy corto, que en su base presenta rizoides. Se definieron cuatro estadios durante la germinación a partir de la emergencia de hipófilo, hiperfilo y primer eófilo.

PALABRAS CLAVE

Anatomía, cotiledón, eófilo, plántulas, reservas seminales, *Rhodophiala bifida*, semillas.

INTRODUCCIÓN

La familia Amaryllidaceae comprende actualmente 73 géneros (APG IV, 2016) y alrededor de 1650 especies (Alzate *et al.*, 2019), distribuidas principalmente en zonas tropicales, con grandes centros de diversidad en Sudamérica, Sudáfrica y la región Mediterránea (Meerow & Snijman, 1998). En Argentina incluye 18 géneros, siendo *Zephyranthes* Herb. uno de los más importantes, representado por 49 especies (Anton & Zuloaga, 2022).

Recientemente, García *et al.* (2019) propusieron una nueva clasificación genérica dentro de la tribu Hippeastreae y como resultado se han incluido nuevas especies dentro del género *Zephyranthes*. Uno de estos casos lo constituye *Zephyranthes bifida* (Herb.) Nic.García & Meerow, anteriormente denominada *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub, que fue incluida en el subgénero *Neorhodophiala* Nic. García & Meerow. El subgénero comprende a esta única especie polimórfica, de amplia distribución geográfica que abarca el noreste de la República Argentina (Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos, Misiones), Uruguay, sur de Brasil y Paraguay.

Zephyranthes bifida (Fig. 1A-B) es una hierba bulbosa, con hojas lineares, subcarnosas, que aparecen durante o después de la floración (Hurrell & Roitman, 2009; García *et al.*, 2019). En la

provincia de Buenos Aires florece a fines de verano y principios de otoño (Hurrell & Roitman, 2009). Las flores con perigonio infundibuliforme y tépalos rojo carmín, rojo bermellón, rojo vinoso, purpúreos, rosados o blancos, se disponen en inflorescencias 2-8 floras, protegidas por una espata formada por dos brácteas separadas o unidas, y sostenidas por un escapo de 10-30 cm de altura (Fabris, 1969; Hurrell & Roitman, 2009; García *et al.*, 2019). El fruto es una cápsula globosa trilocular con numerosas semillas que son dispersadas por el viento (Hurrell & Roitman, 2009).

Sus características florales le confieren valor ornamental (Soto *et al.*, 2011; Facciuto *et al.*, 2021), razón por la cual se la cultiva (Dimitri, 1987; Hurrell & Roitman, 2009). Por su bajo requerimiento hídrico y nutricional, ha sido propuesta especialmente para xerojardinería (Facciuto *et al.*, 2021), práctica que permite ahorrar cantidades significativas de agua (Sovocool *et al.*, 2006). Además, sus bulbos contienen montanina, un alcaloide que presenta actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante (Castilhos *et al.*, 2007), entre otras propiedades de interés farmacológico (Farinon *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2019).

Existen varios estudios sobre *Z. bifida* referidos a su germinación (Echeverría & Alonso, 2010;

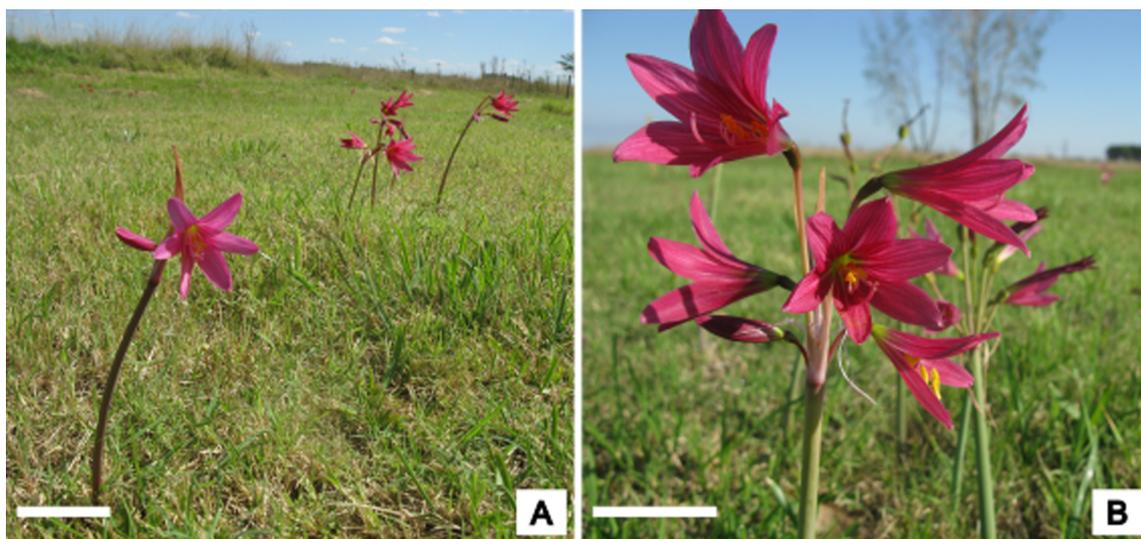


Fig. 1. *Zephyranthes bifida*. **A:** Individuos en campo colindante al Campus UNCPBA (Azul, Buenos Aires). **B:** Flores. Escalas = A-B: 4 cm.

Acosta *et al.*, 2021a), biología reproductiva (Facciuto *et al.*, 2021), diversidad genética (Schwedersky *et al.*, 2020) y mayormente a sus alcaloides de interés medicinal (Castilhos *et al.*, 2007; Farinon *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2019). Como parte de trabajos publicados que incluyen otras especies, se han realizado descripciones morfológicas del bulbo, hojas, escapo, flores, frutos y semillas de *Z. bifida* (Arroyo, 1984; Hurrell & Roitman, 2009; García *et al.*, 2019), pero en ninguno de los casos se profundizó en el estudio de sus plántulas, la morfología de sus embriones, ni la naturaleza de las reservas de sus semillas. Anatómicamente, solo se han descrito algunas características en individuos adultos (Arroyo & Cutler, 1984), y en cuanto a la estructura interna de las semillas y sus reservas, solo se conocen algunos aspectos generales para la familia Amaryllidaceae (Martin, 1946; Meerow & Snijman, 1998; Baskin & Baskin, 2007).

El estudio de las estructuras seminales y de las plántulas permite generar conocimientos básicos para la interpretación de estadios de desarrollo en la transición semilla-plántula. La evaluación de este paso crítico resulta importante en términos de calidad y vigor de semillas (Besnier Romero, 1989; Peretti, 1994). Ambos aspectos permiten tener una aproximación de la capacidad de una muestra de semillas en la producción de plántulas normales (Peretti, 1994). Esta información es de interés para la reproducción por semillas en general (ISTA, 2006) y en particular para especies con potencial ornamental (ISTA, 2008).

Asimismo, la morfología interna de las semillas, especialmente la forma del embrión y el tamaño del mismo en relación con el endosperma, junto con algunas características químicas como el tipo de sustancias de reserva, son aspectos importantes para determinar relaciones filogenéticas (Baskin & Baskin, 2007; Lidueña Pérez & Martelo Solórzano, 2018) y están asociados con la morfología inicial de las plántulas (Garwood, 1996). Según Gross (1988), las semillas pueden proporcionar excelentes características para el diagnóstico, ya que son menos susceptibles a los cambios ambientales. En este sentido, Pereira *et al.* (2008) mencionan que el conocimiento de la morfología de las semillas y el desarrollo postseminal puede contribuir a la diferenciación de grupos taxonómicos, además de ayudar a los análisis de germinación

y conservación de semillas, y a los estudios de regeneración en ecosistemas naturales. De hecho, una caracterización detallada de las semillas, germinación y morfología de las primeras etapas de las plántulas, ha proporcionado información importante para la circunscripción taxonómica en algunas familias como Bromeliaceae (Lidueña Pérez & Martelo Solórzano, 2018). Sin embargo, en Amaryllidaceae, con tribus con complejas e intrincadas historias taxonómicas y evolutivas (Sassone & Giussani, 2018; García *et al.*, 2019), no se han utilizado semillas y plántulas para diferenciar taxones (Arroyo-Leuenberger & Leuenberger, 2009; Sassone *et al.*, 2013; Sassone & Arroyo-Leuenberger, 2018), tal vez por el bajo valor relativo a nivel taxonómico de estas estructuras.

Las plántulas de Monocotyledoneae tienen una estructura compleja y si bien hay una larga tradición de investigaciones sobre su morfología, muchas de las descripciones son superficiales, utilizan una terminología inexacta y a menudo incorrecta o engañosa (Tillich, 1995; 2007). Tillich estudió las plántulas de algunos grupos de Monocotyledoneae como las familias Araceae (Tillich, 2003a), Iridaceae (Tillich, 2003b), Hanguanaceae y Flagellariaceae (Tillich, 1996). En una de sus publicaciones (Tillich, 2007), ofrece un glosario ilustrado con sinónimos, para estandarizar las descripciones y permitir comparaciones. La terminología de Tillich (1995; 1998; 2000; 2003a; 2007) se ha utilizado para describir la morfología de plántulas de especies de Araceae (Maciel *et al.*, 2012), Araceae (Almeida, 2006), Smilacaceae (Martins *et al.*, 2011) y Bromeliaceae (Pereira *et al.*, 2008). Sin embargo, las plántulas de Amaryllidaceae han sido descritas muy brevemente, y aunque Tillich (1995) incluyó en su trabajo esquemas de plántulas de algunos géneros de esta familia, entre ellos *Zephyranthes*, no se menciona sobre qué especies se realizaron.

En este trabajo, se estudia por primera vez la plántula de *Z. bifida* y se caracterizan sus semillas. Los objetivos son describir particularmente el cotiledón y la primera hoja utilizando la terminología de Tillich (1995; 2007) y aportar algunas características anatómicas, así como brindar información acerca de la relación embrión/endosperma y del tipo de sustancias de reserva de la semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Los frutos y semillas de *Z. bifida* se recolectaron en abril de 2022 (Fig. 1A-B), en el Partido de Azul, en un campo colindante con la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). El sitio se encuentra ubicado en la Pampa Deprimida (Morello *et al.*, 2012) y fue caracterizado como una planicie con geoformas de relieve positivo (lomas), con presencia de tosca calcárea a diferentes profundidades del perfil del suelo; siendo el tipo de vegetación dominante el flechillar (Valicenti & Cachena, 2018).

Los ejemplares de *Z. bifida* de los cuales se obtuvieron los frutos y semillas, fueron identificados (Fabris, 1969; Hurrell & Roitman, 2009) y depositados en el Herbario FAA (Thiers, 2022). Los frutos y semillas recolectados se secaron y almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel madera.

Material estudiado. ARGENTINA. Prov. Buenos Aires: Pdo. Azul, Azul, S 36° 45' 56,99" O 59° 52' 59,82", 6-IV-2022, Goyenche 14 (FAA 11.681).

Caracterización de semillas y pruebas histoquímicas

En diez frutos se contabilizó el número de semillas por lóculo y se las clasificó como completas o vanas dependiendo de si presentaban (o no) aspecto papiráceo y tamaño reducido, a ojo desnudo.

Para las pruebas histoquímicas, se utilizaron semillas completas e hidratadas por 30 minutos sobre papeles absorbentes humedecidos con 4,5 mL de agua destilada. Posteriormente, se les retiró la cubierta seminal con ayuda de cinta adhesiva. En cada semilla, se realizaron cortes transversales a diferentes alturas, a mano alzada y con hoja de afeitar, para ser observados directamente, luego de las tinciones, con microscopio óptico Zeiss Primo Star.

Para la detección de almidón y lípidos, se utilizó Lugol y Sudán IV, respectivamente (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Para la detección de proteínas se empleó el reactivo Amido Black en solución 0,5% m/v en ácido acético al 7% v/v (Llewellyn, 2019).

Caracterización de embriones

Los embriones se extrajeron de semillas hidratadas durante dos días, momento anterior a su germinación. Para esto, se removió la cubierta seminal con ayuda de cinta adhesiva y con aguja

histológica se extrajo el embrión. Con el objetivo de observar mejor sus estructuras, los embriones extraídos fueron teñidos con verde de malaquita (Peretti, 1994). Las observaciones se realizaron con microscopio estereoscópico Olympus SZH10. Se tomaron fotografías de las semillas con la cubierta removida y de los embriones extraídos. Dada la uniformidad externa y en el comportamiento germinativo de las semillas completas provenientes de la población estudiada (Acosta *et al.*, 2021a), se analizaron 10 unidades seleccionadas al azar. Se obtuvieron las relaciones superficie embrión/superficie endosperma y longitud vaina/longitud hiperfilo, utilizando el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). En el primer caso, se empleó la herramienta "Polygon selections" para medir áreas, mientras que para la vaina y el hiperfilo se midió la longitud de ambas estructuras utilizando líneas rectas y segmentadas (Gonzalez, 2018).

Obtención de plántulas

Las plántulas se obtuvieron por germinación. Se colocaron en cuatro cajas de Petri, 15 semillas (sin desinfectar previamente) sobre una hoja de papel de filtro y cuatro hojas de papel toalla humedecidas con 4,5 ml de agua destilada. Para evitar la desecación, cada caja de Petri fue colocada individualmente dentro de un envase plástico transparente con tapa, apoyado sobre una goma espuma embebida en agua. Los envases plásticos fueron colocados de a pares en bandejas plásticas con agua y envueltas con bolsas de polietileno transparentes, con el fin de preservar humedad próxima a la saturación, contribuir al mantenimiento de la temperatura y permitir la entrada de luz. La temperatura de germinación fue de 20°C y el fotoperíodo de 12 horas de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes. Se definió el momento de la germinación como aquél en que se observó al menos 1 mm del embrión sobresaliendo de las cubiertas seminales rotas.

Caracterización de plántulas

Se realizó un seguimiento de las plántulas durante diez días desde la germinación. Las observaciones se efectuaron con microscopio estereoscópico, se tomaron fotografías, y se definieron estadios según cambios externos distinguibles visualmente. Una descripción morfológica más completa de las plántulas se realizó a los diez días desde la germinación, utilizando la terminología de Tillich

(1995; 2007). A partir de esta descripción se interpretaron las estructuras del embrión.

Para el estudio de la anatomía, se realizaron preparados temporarios de material fresco con plántulas de diez días desde la germinación, seleccionadas al azar. Los cortes transversales se realizaron a mano alzada, con hoja de afeitar, y se observaron con microscopio óptico.

RESULTADOS

Caracterización de semillas y pruebas histoquímicas

El número de semillas por lóculo osciló entre 16 y 37, de las cuáles entre 0 y 20 tenían aspecto de vanas (Fig. 2A-C). El total de semillas por fruto fue muy variable: entre 50 y 92. Las semillas completas son planas y aladas (Fig. 2D). La cubierta seminal está formada externamente por una testa negra y brillante, e internamente por un tegmen reducido a una película delgada, traslúcida y de color castaño, que recubre al endosperma de consistencia firme, blanquecino y semitransparente (Fig. 2E).

Respecto a las pruebas histoquímicas, tanto en el embrión como en el endosperma (Fig. 3A), el reactivo Amido Black evidenció cuerpos proteicos de color azul oscuro (Fig. 3B). La coloración con Sudán IV permitió observar cuerpos rojizos también en ambas estructuras, mostrando la presencia de lípidos (Fig. 3C). Con el reactivo de Lugol no se obtuvo coloración azul-violácea, indicando la ausencia de almidón.

Caracterización de embriones

El embrión se ubica en el centro de la semilla (Fig. 2E). Es recto (Fig. 4A), excepto en algunos casos en los que se observa una leve curvatura en alguno de los extremos (Fig. 4B). Externamente sólo se observa el cotiledón; el eje embrionario es inconspicuo. La superficie del embrión relativa al endosperma es de 0,1780 (D.E. = $\pm 0,0236$), es decir, menos de un cuarto de la superficie de la semilla.

La forma del cotiledón es cilíndrica (Fig. 4A), de sección transversal elíptica (Fig. 3A). El largo promedio del cotiledón es de 5,1 mm. Se divide

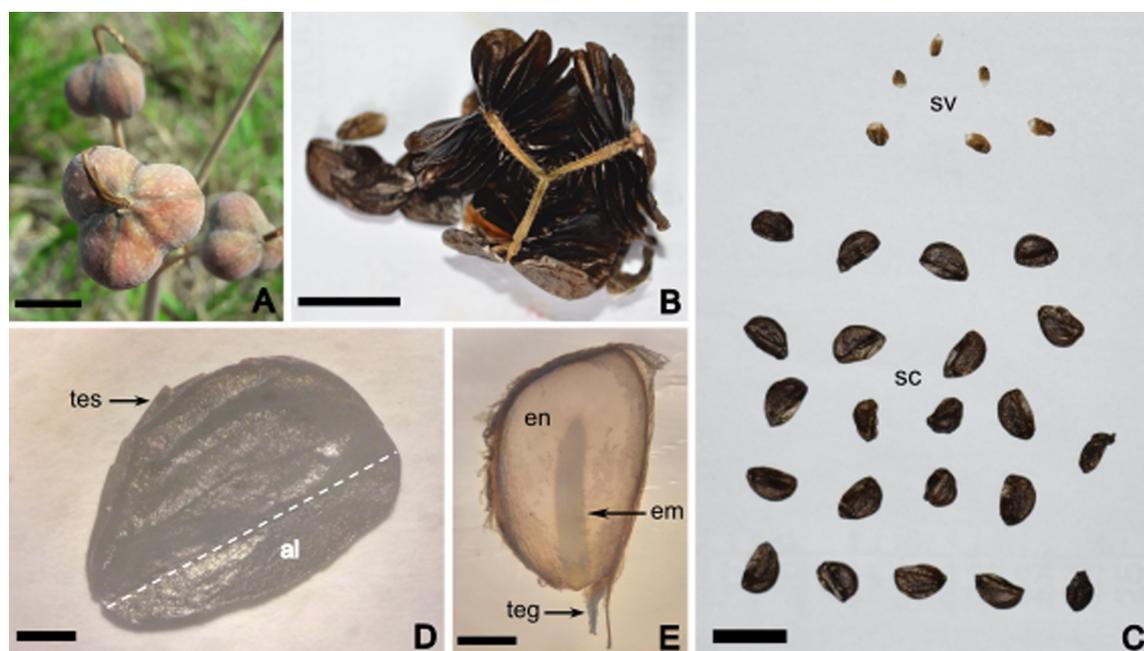


Fig. 2. Frutos y semillas de *Z. bifida*. **A:** Cápsulas cerradas. **B:** Cápsula abierta con semillas. **C:** Semillas completas y vanas de un lóculo. **D:** Semilla. **E:** Semilla con cubierta removida. Abreviaturas = al: ala de la semilla; em: embrión; en: endosperma; sc: semillas completas; sv: semillas vanas; tes: testa; teg: restos del tegmen. Escalas = A-B: 1 cm; C: 1,4 cm; D-E: 1,5 mm.

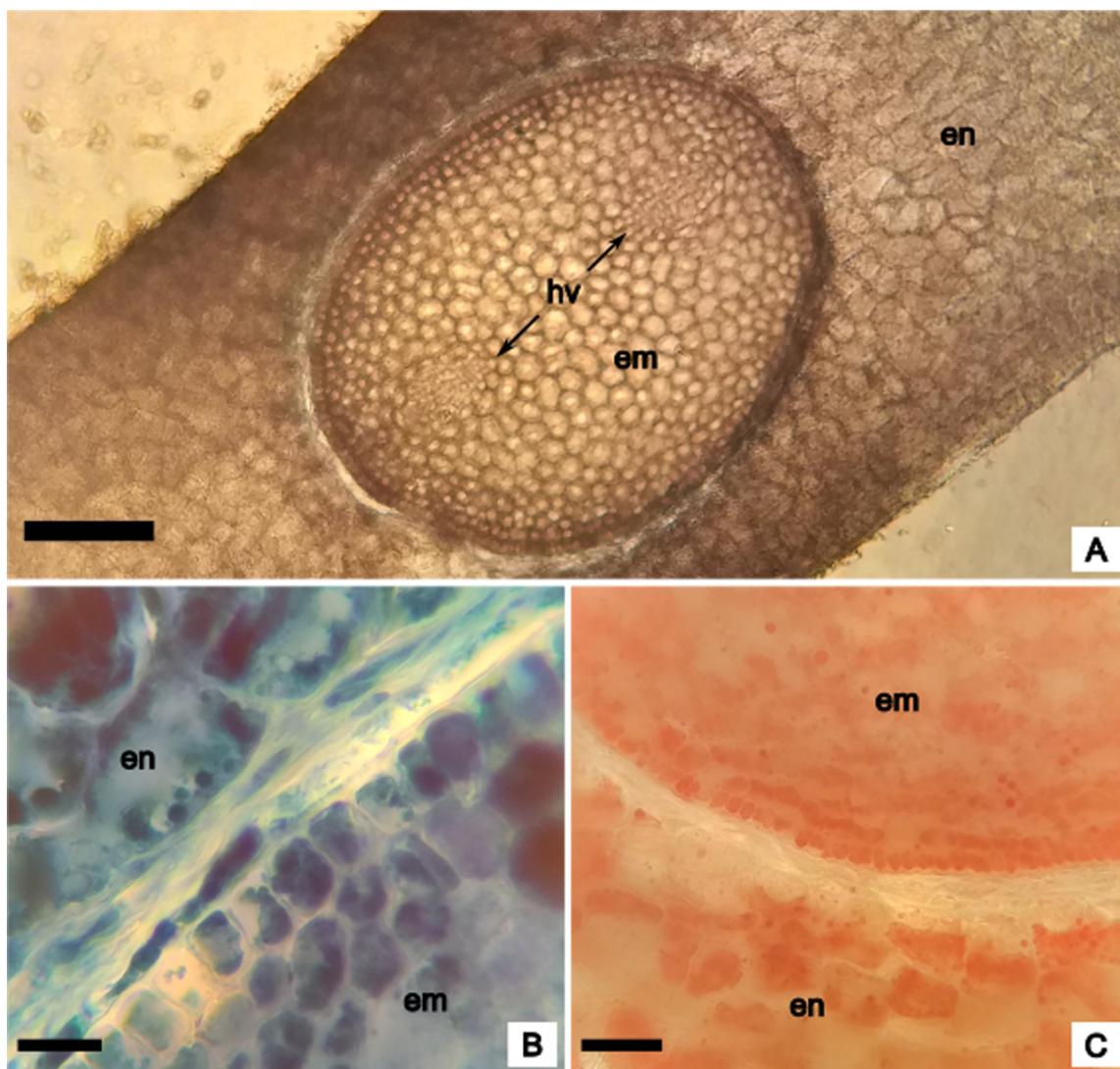


Fig. 3. Pruebas histoquímicas en semillas de *Z. bifida*. **A:** Embrión y endosperma en corte transversal a la altura del segmento distal del hiperfilo cotiledonar. **B:** Embrión y endosperma con Amido Black. **C:** Embrión y endosperma con Sudán IV. Abreviaturas = em: embrión; en: endosperma; hv: haz vascular. Escalas = A: 200 μ m; B: 50 μ m; C: 20 μ m.

en un hipofilo o vaina (parte inferior de la hoja cotiledonar) y un hiperfilo (parte superior de la hoja cotiledonar) (Fig. 4D). Entre el hipofilo y el hiperfilo se observa el anillo del hipofilo, que representa el margen superior (circular) del mismo. La longitud del hiperfilo con respecto al hipofilo, a los dos días de hidratación, es mayor; aproximadamente con una relación 2:1 (hiperfilo/hipofilo). El hipofilo, incluyendo al anillo, tiene

una longitud promedio de 1,7 mm, mientras que el hiperfilo mide en promedio 3,4 mm.

En el embrión, el primer eófilo (primera hoja) presenta exteriormente una estructura similar a la del cotiledón, consta de una lámina cilíndrica y una vaina (Fig. 4D). Para visualizar al eófilo antes de su emergencia, es necesario presionar el hipofilo del cotiledón para que asome por el anillo (Fig. 4C).

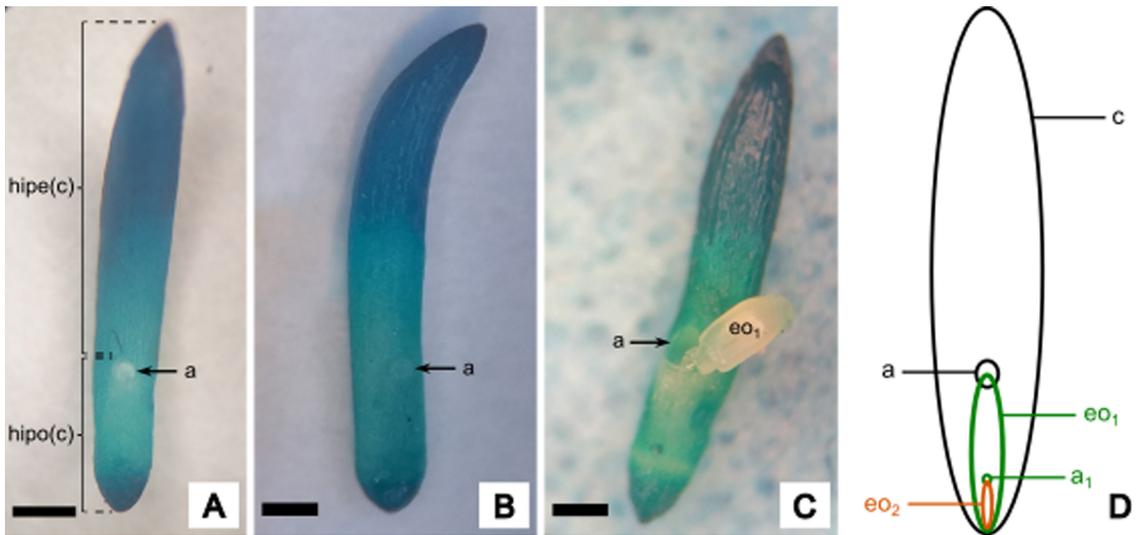


Fig. 4. Embrión de *Z. bifida*. **A:** Embrión recto. **B:** Embrión curvado en extremo haustorial. **C:** Primer eófilo emergiendo por el anillo del hipofilo cotiledonar. **D:** Esquema interpretativo de las estructuras embrionarias aplicando la terminología de Tillich. Abreviaturas = a: anillo del hipofilo cotiledonar; a1: anillo del primer eófilo; c: cotiledón; eo1: primer eófilo; eo2: segundo eófilo; hipe(c): hiperfilo cotiledonar; hipo(c): hipofilo cotiledonar. Escalas = A-C: 0,5 mm.

Caracterización de plántulas a diez días de la germinación

En el cotiledón se distingue un hipofilo o vaina (parte inferior de la hoja cotiledonar) y un hiperfilo (parte superior de la hoja cotiledonar) (Fig. 5A). El hipofilo es cerrado (tubular) y bifacial (Fig. 6A). El margen superior del hipofilo es circular, en forma de anillo (Fig. 5B), por el cual emerge el primer eófilo (primera hoja plumular). Por dentro del hipofilo, en el extremo inferior (base del cotiledón), se halla un corto eje embrionario. La estructura interna del hipofilo, es asimétrica (Fig. 6A) si se considera como plano de simetría el eje mayor de la sección transversal, ya que el eófilo se encuentra desplazado hacia el lado del anillo, y los dos haces vasculares colaterales del hipofilo se localizan en el lado opuesto. La epidermis exterior del hipofilo es uniestratificada, con cutícula lisa. Subyacentes, se disponen dos a tres capas de clorénquima, que se continúan por un parénquima reservante (de mayor espesor en el lado donde se ubican los haces vasculares) con abundantes amiloplastos (Fig. 6D), hasta alcanzar la epidermis interior, también uniestratificada, con cutícula más delgada.

El hiperfilo cotiledonar es una estructura unifacial, sin márgenes (Fig. 6B). En él se distinguen dos segmentos: uno proximal (con respecto al hipofilo o vaina) y otro distal (Fig. 5E). La zona proximal del hiperfilo adquiere actividad fotosintética bajo iluminación y se alarga separando a la semilla de la vaina cotiledonar (Fig. 5A-B). A los diez días desde la germinación tiene forma curva, semejante a un gancho (en forma de U). Se observó que este segmento levanta a la semilla del sustrato de germinación (Fig. 5C). En corte transversal, su estructura interna (Fig. 6B) presenta una epidermis uniestratificada con cutícula lisa. Subyacente a la epidermis se dispone el parénquima fotosintético, hasta la altura de los dos haces vasculares colaterales, ubicados hacia ambos extremos del eje mayor del corte. En la zona central, el parénquima no fotosintético está constituido por células isodiamétricas que aumentan de tamaño hacia el interior.

El segmento distal del hiperfilo (Fig. 5E) es incoloro, tiene función haustorial, está en contacto con el endosperma, y permanece inserto completamente en la semilla. Es cilíndrico, de sección transversal elíptica (Fig. 3A). Su estructura

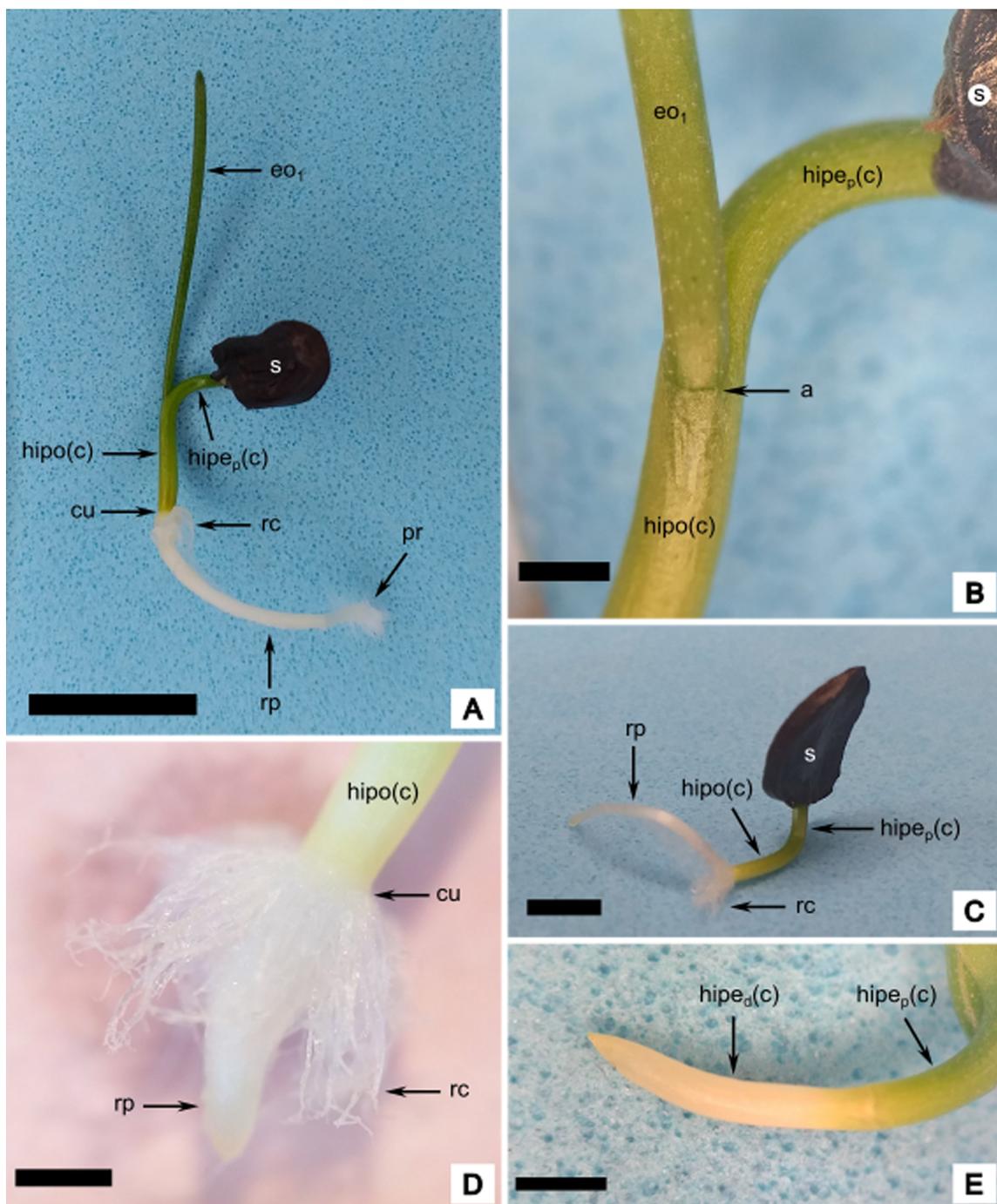


Fig. 5. Plántula de *Z. bifida*. **A:** Cotiledón, raíz primaria y primer eófilo. **B:** Zona del anillo del hipofilo cotiledonar. **C:** Segmento proximal del hiperfilo cotiledonar levantando a la semilla durante la germinación. **D:** Rizoides del cuello (collarete). **E:** Segmento distal del hiperfilo cotiledonar (haustorio). Abreviaturas = a: anillo del hipofilo cotiledonar; cu: cuello; eo₁: primer eófilo; hipe(c): hiperfilo cotiledonar; hipe_d(c): segmento distal del hiperfilo cotiledonar; hipe_p(c): segmento proximal del hiperfilo cotiledonar (haustorio); hipo(c): hipofilo cotiledonar; pr: pelos radiculares; rc: rizoides del cuello; rp: raíz primaria; s: semilla. Escalas = A: 1 cm; B: 1 mm; C: 3 mm; D: 1 mm; E: 1,5 mm.

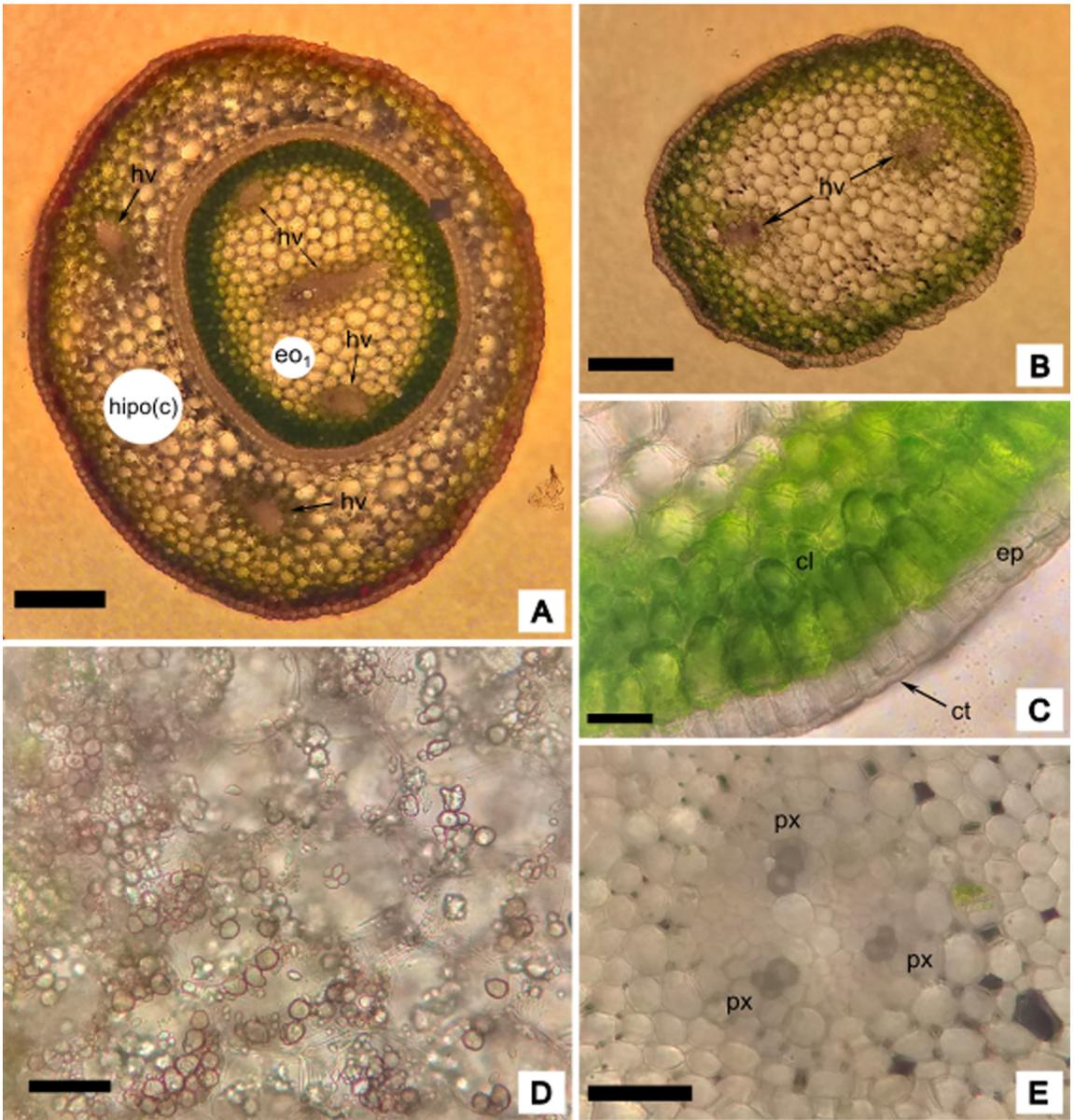


Fig. 6. Anatomía de la plántula de *Z. bifida*. **A:** Estructura interna del hipofilo cotiledonar y de la lámina del primer eófilo en corte transversal (CT). **B:** Estructura interna del segmento proximal del hiperfilo cotiledonar en CT. **C:** Epidermis y clorénquima del hiperfilo del primer eófilo en CT. **D:** Amiloplastos en parénquima reservante del hipofilo cotiledonar. **E:** Cilindro central de la raíz primaria en CT. Abreviaturas = cl: clorénquima; ct: cutícula; eo₁: primer eófilo; ep: epidermis; hipo(c): hipofilo cotiledonar; hv: haz vascular; px: polo de protoxilema. Escalas = A-B: 200 µm; C-E: 50 µm.

interna presenta las mismas características que el segmento proximal, con la excepción de que carece de cloroplastos y la cutícula es más delgada.

El primer eófilo (primera hoja plumular)

emerge por el anillo de la vaina del cotiledón (Fig. 5B). En el eófilo se distingue el hiperfilo (o lámina) y el hipofilo (o vaina), análogamente a la estructura externa del cotiledón. El hipofilo

del eófilo es bifacial, tubular y tiene el margen superior en forma de anillo (por donde emergerá la segunda hoja). El hiperfilo es cilíndrico (Fig. 5A), de sección transversal elíptica (Fig. 6A). Su estructura interna presenta una epidermis uniestratificada, con cutícula lisa (Fig. 6A, C). Por debajo se dispone el clorénquima, conformado por una capa externa de células alargadas, similares a las de un parénquima en empalizada; que se continúa con dos a cuatro capas de células más redondeadas que se extienden hasta los haces vasculares. El parénquima no fotosintético está constituido por células isodiamétricas que aumentan de tamaño hacia el interior. Se observan tres haces vasculares colaterales alineados en el eje mayor de la sección transversal: uno central de mayor tamaño y dos más pequeños ubicados hacia los extremos.

El hipocótilo es muy breve, de modo que la raíz primaria parece estar unida directamente con la base del cotiledón (Fig. 5A, C). En el cuello, la región de transición entre el hipocótilo y la raíz primaria, que representa realmente la parte inferior del hipocótilo, se observan densos y largos tricomas (rizoides del cuello) que forman un collarite (Fig. 5D).

A los diez días desde la germinación, la raíz primaria ya presenta pelos radiculares. En cuanto a la estructura interna, en corte transversal en la zona cercana al cuello, el cilindro vascular presenta entre tres y cuatro polos de protoxilema (Fig. 6E).

Estadios durante diez días desde la germinación

Se definieron cuatro estadios durante diez días desde la germinación:

Estadio 0 (E0): Semillas hidratadas antes de la protrusión (Fig. 2E).

Estadio 1 (E1): Emergencia del hipofilo o vaina del cotiledón (Fig. 7A).

Estadio 2 (E2): Emergencia del hiperfilo del cotiledón (Fig. 7B).

Estadio 3 (E3): Emergencia del primer eófilo por el anillo del hipofilo cotiledonar (Fig. 7C).

La germinación inicia con la protrusión del hipofilo del cotiledón, entre los cuatro y cinco días desde la siembra. La parte inferior del cotiledón participa durante la germinación en empujar y proteger al eje embrionario (Fig. 7A-B).

Los primeros rizoides del cuello (Fig. 7D) se

observaron entre E1 y E2, cuando el anillo del hipofilo del cotiledón emerge completamente de la semilla producto de la elongación del segmento distal del hiperfilo cotiledonar. A partir de la aparición de los rizoides del cuello, prosigue el crecimiento evidente de la raíz primaria.

Luego de la emergencia del primer eófilo (E3), los cambios visibles hasta los diez días desde la germinación, consisten en el crecimiento en longitud del hiperfilo del primer eófilo y la raíz primaria; y en esta última, la aparición de los pelos radiculares.

A los diez días desde la germinación, los rizoides del cuello persisten, y en algunas plántulas, el haustorio (segmento distal del hiperfilo cotiledonar) ya se encuentra en senescencia (Fig. 7E).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Caracterización de semillas y pruebas histoquímicas

El número máximo de semillas (92) coincide aproximadamente con el señalado por Echeverría & Alonso (2010) para frutos con buen desarrollo, aunque se hallaron frutos con una cantidad de semillas considerablemente menor (50). Se debe tener en cuenta que estas autoras trabajaron con semillas procedentes de poblaciones silvestres de Sierra de los Padres (sudeste del Sistema de Tandilia, Buenos Aires). Así también, el número de semillas es considerablemente mayor a los registrados por Facciuto *et al.* (2021), que no superan las 50 por fruto. En este caso, el material procede de una población naturalizada del Partido de Hurlingham (Buenos Aires).

Según las características de la cubierta seminal, esta semilla podría clasificarse como testal (Danilova *et al.*, 1995). En este tipo de semillas, el tegumento interno del óvulo se desintegra durante el desarrollo seminal, persistiendo en la cubierta como una película sin estructura.

Las reservas más abundantes de las semillas (tanto en el embrión como en el endosperma) están compuestas por lípidos y proteínas, por lo que puede concluirse que el endosperma es no amiláceo, conforme a lo señalado por Martín (1946) para las Amaryllidaceae. Sería deseable corroborar la presencia de hemicelulosas en el

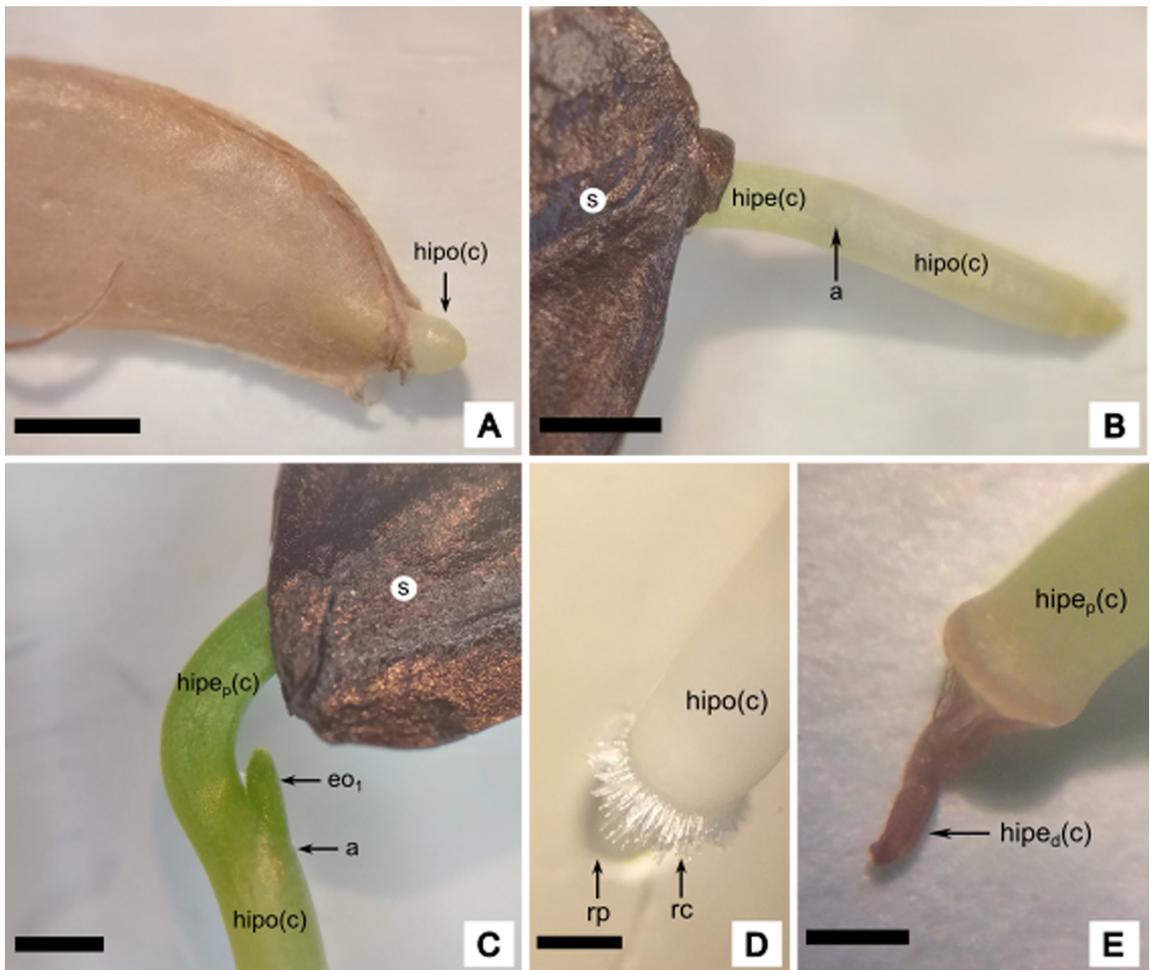


Fig. 7. Estadios durante la germinación en *Z. bifida*. **A:** E1. **B:** E2. **C:** E3. **D:** Rizoides del cuello incipientes. **E:** Segmento distal del hiperfilo cotiledonar (haustorio) en senescencia. Abreviaturas = a: anillo del hipofilo cotiledonar; eo_1 : primer eófilo; $hipe(c)$: hiperfilo cotiledonar; $hipe_d(c)$: segmento distal del hiperfilo cotiledonar; $hipe_p(c)$: segmento proximal del hiperfilo cotiledonar (haustorio); $hipo(c)$: hipofilo cotiledonar; rc: rizoides del cuello; rp: raíz primaria. Escalas = A-B: 1,5 mm; C-D: 1 mm; E: 0,5 mm.

endosperma, mencionada por Meerow & Snijman (1998) como característica de la familia.

Caracterización de embriones

En relación a las características del embrión, su forma lineal y recta (salvo algunas excepciones) y la posición central en la semilla, se condice con lo señalado por Martin (1946) para el género *Zephyranthes*. Asimismo, la consistencia del endosperma coincide con las características consideradas comunes para Liliaceae, Iridaceae y

Amaryllidaceae (Martin, 1946). Respecto al tamaño relativo del embrión, Martin (1946) menciona que para estas tres familias es relativamente pequeño y ocupa menos de una cuarta parte del volumen de la semilla. En este trabajo, se realizó una aproximación a partir de la superficie relativa del embrión, la cual no alcanza el 25% de la superficie de la semilla.

Danilova *et al.* (1995) describieron tres tipos de estructuras de embrión para Monocotyledoneae. El embrión de esta especie se ubica en el segundo

tipo: cotiledón con grado variable de función haustorial; dado que la parte superior del hiperfilo (o segmento distal) cumple esa función. El haustorio tiene diferentes formas según la forma de la semilla: cilíndrico, globular o aplanado (Tillich, 2007); en este caso es cilíndrico.

Según Danilova *et al.* (1995), en este tipo de embrión la parte inferior del cotiledón participa en empujar y proteger el eje embrionario durante la germinación. En este caso, se observó que la parte del cotiledón que se elonga considerablemente es el segmento proximal del hiperfilo, mientras que la elongación del hipofilo es menor, comparativamente. Por lo tanto, el hipofilo del cotiledón protege a la plúmula, y el empuje del eje embrionario hacia el exterior de la cubierta seminal es provocado principalmente por la elongación del segmento proximal del hiperfilo.

Caracterización de plántulas y estadios

De las tres formas que puede presentar el hiperfilo cotiledonar (Tillich, 2007), en *Z. bifida* forma una vaina baja que abraza al nudo cotiledonar sin excrecencias secundarias.

En base a los resultados, el segmento proximal del hiperfilo cotiledonar, denominado tradicionalmente “parte media” (Tillich, 1995), es el primer órgano asimilador de la plántula. Si además se considera que este segmento levanta a la semilla del suelo, como ocurre en el sustrato de germinación, cumple con las condiciones para ser considerado *phaneromer* (Tillich, 2007). En este aspecto, difiere con las observaciones de Tillich (1995) para Amaryllidaceae, donde el hiperfilo es generalmente corto y a veces solo tiene función haustorial, como en el género *Zephyranthes*. Se debe tener en cuenta que este género está constituido por numerosas especies (García *et al.*, 2019) y puede haber diferencias entre ellas. Además, Tillich trabajó con plántulas producidas con luz permanente, y en este caso fueron obtenidas con fotoperíodo (12 hs), dado que las semillas son fotoblásticas neutras (Echeverría & Alonso, 2010; Acosta *et al.*, 2021a).

En Amaryllidaceae, Tillich (1995) describió el hiperfilo del cotiledón como bifacial. Posteriormente, consideró que solo había unos pocos ejemplos cuestionables y que los dos segmentos del hiperfilo eran unifaciales (Tillich, 2007). En este trabajo se confirmó que para *Z.*

bifida, los dos segmentos son efectivamente unifaciales, con dos haces vasculares.

El hiperfilo del primer eófilo es cilíndrico, de sección elíptica, y tiene aspecto filiforme, como señalan Echeverría & Alonso (2010) para las hojas de las plántulas y las juveniles del primer año. La estructura es unifacial y presenta tres haces vasculares; en contraste con la estructura bifacial de la lámina en individuos adultos (Arroyo & Cutler, 1984).

Las características de breve, inconspicuo y prácticamente indetectable, descritas por Tillich (1995; 2000) para el hipocótilo de las Monocotyledoneae en general, y de las Amaryllidaceae en particular, son aplicables a *Z. bifida*. Asimismo, en la base de su hipocótilo se observaron los rizoides del cuello. La adherencia de estos tricomas al sustrato de germinación (papel de filtro), observada al retirar las plántulas, resulta consistente con la hipótesis de Tillich (2000; 2007) sobre su función como primera estructura de contacto firme con el sustrato, además de que probablemente contribuyan a la absorción de agua e iones antes de que se desarrollen los pelos radiculares (Tillich, 2000). Sin embargo, en este trabajo se comprobó que, a los diez días desde la germinación, cuando la raíz primaria ya presenta pelos radiculares, los rizoides del cuello persisten.

En 1995, Tillich consideró al término radícula como sinónimo de raíz primaria. Aunque en 2007 diferencia ambos conceptos, aclarando que la radícula del embrión da origen a la raíz primaria durante la germinación. En cuanto a la estructura interna, la raíz primaria de *Z. bifida* es triarca o tetarca como en la mayoría de las Monocotyledoneae (Tillich, 1995).

En este trabajo se describió por primera vez la plántula de *Z. bifida*. Se desconoce el valor diagnóstico de sus características (o de cada una de sus partes) a nivel específico, por cuanto aún no se han realizado estudios morfológicos y anatómicos en otras especies del género. En estudios preliminares de *Z. tubispatha* (L'Hér.) Herb. (Acosta *et al.*, 2021b), se observó menor desarrollo en la longitud del *phaneromer*, al igual que en el esquema de plántula presentado por Tillich (1995) para *Zephyranthes* (sin indicar la especie). Futuros trabajos que incluyan un mayor número de especies podrían dilucidar este aspecto y otras diferencias.

Dado que uno de los impactos adversos del cambio climático es la escasez de agua (IPCC, 2022), adquiere relevancia el cultivo de esta especie ornamental apta para xerojardinería (Soto *et al.*, 2011; Facciuto *et al.*, 2021). Esto, sumado a su potencial farmacológico (Castilhos *et al.*, 2007; Farinon *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2019), otorga valor al conocimiento de las características de las semillas y plántulas, y de los primeros estadios de desarrollo. En este sentido, la descripción de la plántula en las condiciones utilizadas para este trabajo, consideradas óptimas según Acosta *et al.* (2021a), también es útil para pruebas de calidad y vigor de las semillas, ya que permitiría detectar y evaluar anomalías en las plántulas. Particularmente para especies ornamentales, la International Seed Testing Association toma esta información como base de algunas pruebas para cuantificar el vigor (ISTA, 2008).

Este trabajo brinda información de utilidad para optimizar la propagación por semillas de *Z. bifida*, la cual cobra importancia ya que la multiplicación por bulbos (Dimitri, 1987; Hurrell & Roitman, 2009) compromete la conservación de las poblaciones naturales de esta especie nativa, que al menos en la provincia de Buenos Aires ha sido categorizada como vulnerable (Delucchi, 2006).

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

RLS y VTM diseñaron la investigación y obtuvieron los primeros resultados de los análisis morfológicos de las plántulas. JMG realizó las observaciones de los estadios de germinación, completó las observaciones sobre la morfología de las plántulas, obtuvo e interpretó los cortes anatómicos, tomó fotografías, realizó las mediciones con ImageJ y diseñó las figuras. JMG y MCA realizaron las pruebas histoquímicas. MCA y MLA realizaron los ensayos de germinación y aportaron información general de las semillas. Todos los autores contribuyeron en el análisis e interpretación de los datos, así como en la redacción del manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a H. Fabio Causin (IBBEA-UBA) por el asesoramiento en las pruebas histoquímicas

y al Consejo Interuniversitario Nacional por el apoyo económico al becario. Este trabajo fue financiado con fondos provenientes de la Secretaría de Ciencia, Arte y Tecnología y de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, M. C., M. L. ALCARAZ, R. L. SCARAMUZZINO & V. T. MANFREDI. 2021a. Fisiología de la germinación de *Rhodophiala bifida*. *FAVE: Secc. Cienc. Agrar.* 20: 159-173. <https://doi.org/10.14409/fa.v20i1.10256>
- ACOSTA, M. C., J. M. GOYENETCHE, M. L. ALCARAZ, R. L. SCARAMUZZINO & V. T. MANFREDI. 2021b. Morfología de plántulas de *Zephyranthes tubispatha* (L'Hér.) Herb. (Amaryllidaceae) del centro de la provincia de Buenos Aires. *XXXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Bol. Soc. Argent. Bot.* 56: 112.
- ALMEIDA, S. L. 2006. *Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de Anthurium coriaceum G. Don (Araceae) em diferentes estádios do desenvolvimento*. Tesis de Maestría. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
- ALZATE, F., M. LESMES, N. CORTÉS, S. VARELA & E. OSORIO. 2019. Sinopsis de la familia Amaryllidaceae en Colombia. *Biota Colomb.* 20: 2-20. <https://doi.org/10.21068/c2019.v20n01a01>
- ANTON A. M. & F. O. ZULOAGA (Dir.). Flora Argentina [online]. Disponible en: <http://www.floraargentina.edu.ar/> [Acceso: 11 abril 2022].
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181: 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- ARROYO, S. C. 1984. Contribución al conocimiento de los bulbos de Amaryllidaceae. *Kurtziana* 17: 55-70.
- ARROYO, S. C. & D. F. CUTLER. 1984. Evolutionary and taxonomic aspects of the internal morphology in Amaryllidaceae from South America and Southern Africa. *Kew Bull.* 39: 467-498. <https://doi.org/10.2307/4108592>
- ARROYO-LEUENBERGER, S. C. & B. LEUENBERGER. 2009. Revision of *Zephyranthes andina* (Amaryllidaceae) including five new synonyms. *Willdenowia* 39: 145-159. <http://dx.doi.org/10.3372/wi.39.39116>

- BASKIN, C. C. & J. M. BASKIN. 2007. A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Sci. Res.* 17: 11-20. <https://doi.org/10.1017/S0960258507383189>
- BESNIER ROMERO, F. 1989. *Semillas. Biología y tecnología*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- CASTILHOS, T. S., R. B. GIORDANI, A. T. HENRIQUES, F. S. MENEZES & J. Â. S. ZUANAZZI. 2007. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcaloide montanina. *Rev. Bras. de Farmacogn.* 17: 209-214. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200013>
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- DANILOVA, M. F., E. N. NEMIROVICH-DANCHENKO, G. A. KOMAR & M. M. LODKINA. 1995. The seed structure of monocotyledons. In: RUDALL, P. J., P. J. CRIBB, D. F. CUTLER & C. J. HUMPHRIES (eds.), *Monocotyledons: systematics and evolution*, pp. 461-472. Royal Botanic Gardens, Kew.
- DELUCCHI, G. 2006. Las especies vegetales amenazadas de la Provincia de Buenos Aires: una actualización. *APRONA Bol. Cient.* 39: 19-31.
- DIMITRI, M. J. 1987. Amarilidáceas. En: DIMITRI, M. J. (ed.), *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, tercera edición, pp. 245-260 y 590-591. ACME, Buenos Aires.
- ECHEVERRÍA, M. L. & S. I. ALONSO. 2010. Germinación y crecimiento inicial de *Habranthus gracilifolius* y *Rhodophiala bifida*, amarilidáceas nativas con potencial ornamental. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 42: 23-37.
- FABRIS, H. A. 1969. Amaryllidaceae. En: CABRERA, A. L. (ed.), *Flora de la Provincia de Buenos Aires*, pp. 520-538. INTA Ediciones, Buenos Aires.
- FACCIUTO, G. R., M. A. COVIELLA & V. L. BUGALLO. 2021. Biología reproductiva de *Rhodophiala bifida* (Amaryllidaceae): aspectos de aplicación en el mejoramiento genético. *FAVE: Secc. Cienc. Agrar.* 20: 147-157. <https://doi.org/10.14409/fa.v20i1.10255>
- FARINON, M., V. S. CLARIMUNDO, G. P. PEDRAZZA, P. S. GULKO, J. A. ZUANAZZI, R. M. XAVIER & P. G. DE OLIVEIRA. 2017. Disease modifying anti-rheumatic activity of the alkaloid montanine on experimental arthritis and fibroblast-like synoviocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 799: 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.013>
- GARCÍA, N., A. W. MEEROW, S. ARROYO-LEUENBERGER, R. S. OLIVEIRA, J. H. DUTILH, P. S. SOLTIS & W. S. JUDD. 2019. Generic classification of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae. *Taxon* 68: 481-498. <https://doi.org/10.1002/tax.12062>
- GARWOOD, N. 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. In: SWAINE, M. (ed.), *The ecology of tropical forest tree seedlings*, pp. 59-129. Parthenon Publishing, New York.
- GONZALEZ, A. M. 2018. ImageJ: una herramienta indispensable para medir el mundo biológico. *Folium, rel. bot.* 1: 6-17.
- GROSS, E. 1988. Bromelienstudien IV. Zur Morphologie der Bromeliaceen-Samen unter Berücksichtigung Systematisch-taxono-mischer Aspekte. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 64: 415-625.
- HURRELL J. A. & G. ROITMAN. 2009. *Rhodophiala*. En: HURRELL, J. A. (ed.), *Flora Rioplatense*, pp. 132-136. Lola, Buenos Aires.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2022. Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2006. *International rules for seed testing*. Bassersdorf.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2008. *ISTA Handbook on Flower Seed Testing*. Bassersdorf.
- LIDUEÑA PÉREZ, K. I. & A. M. MARTELO SOLÓRZANO. 2018. *Morfología, histoquímica y desarrollo post-seminal de semillas de Bromelias (Bromeliaceae) presentes en el Departamento de Sucre-Colombia*. Tesis doctoral. Universidad de Sucre, Colombia.
- LLEWELLYN, B. 2019. StainsFile: the internet resource for histotechnologists [online]. Disponible en: <https://stainsfile.info/xindex.html> [Acceso: 20 Abril 2022].
- MACIEL, N., R. VALERA, M. E. SANABRIA & A. MENDOZA. 2012. Caracteres morfológicos diferenciales del fruto, semilla y plántula de seis palmeras en sotobosque nublado del estado Lara, Venezuela. *UDO Ag.* 12: 801-812.
- MARTIN, A. C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *Am. Midl. Nat.* 36: 513-660.
- MARTINS, A. R., N. PÜTZ, A. D. L. C. NOVEMBRE, S. M. D. S. PIEDADE & B. A. D. GLÓRIA. 2011. Seed germination and seedling morphology of *Smilax polyantha* (Smilacaceae). *Biota Neotrop.* 11: 31-37.

- MEEROW, A. W. & D. A. SNIJMAN. 1998. Amaryllidaceae. In: KUBITZKI, K. (ed.), *Flowering Plants - Monocotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 3, 83-110. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_11
- MORELLO, J., S. D. MATTEUCCI, A. F. RODRÍGUEZ, M. E. SILVA, P. MESOPOTÁMICA & P. LLANA. 2012. *Ecorregiones y complejos Ecosistémicos de Argentina*. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires.
- PEREIRA, A. R., T. S. PEREIRA, Â. S. RODRIGUES & A. C. S. ANDRADE. 2008. Morfología de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Bot. Brasil.* 22: 1150-1162.
<https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000400026>
- PERETTI, A. 1994. *Manual para análisis de semillas*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- REIS, A., K. MAGNE, S. MASSOT, L. R. TALLINI, M. SCOPEL, J. BASTIDA, P. RATET & J. A. ZUANAZZI. 2019. Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant. *Sci. Rep.* 9: 1-11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44746-7>
- SASSONE, A., L. GIUSSANI & E. R. GUAGLIANONE. 2013. Multivariate studies of *Ipheion* (Amaryllidaceae, Allioideae) and related genera. *Plant Syst. Evol.* 299: 1561-1575.
<https://doi.org/10.1007/s00606-013-0819-5>
- SASSONE, A. & S. C. ARROYO-LEUENBERGER. 2018. Revisión Taxonómica de las Especies del Género Sudamericano *Tristagma* (Amaryllidaceae, Allioideae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 103: 163-174.
<https://doi.org/10.3417/2018069>
- SASSONE, A. & L. GIUSSANI. 2018. Reconstructing the phylogenetic history of the tribe Leucocoryneae (Allioideae): Reticulate evolution and diversification in South America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 127: 437-448.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.034>
- SCHNEIDER, C. A., W. S. RASBAND & K. W. ELICEIRI. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9: 671-675.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- SCHWEDERSKY, M. B., M. SCOPEL, L. R. TALLINI, J. BASTIDA, T. T. SOUZA-CHIES, N. H. OLEAS & J. A. S. ZUANAZZI. 2020. Genetic diversity and chemical profile of *Rhodophiala bifida* Populations from Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 30: 427-431.
<https://doi.org/10.1007/s43450-020-00041-5>
- SOTO, M. S., J. A. GREPPI & G. FACCIUTO. 2011. Exploration and collection of ornamental germplasm native to Argentina. *Floriculture Ornamental Biotech.* 5: 10-22.
- SOVOCOL, K. A., M. MORGAN & D. BENNETT. 2006. An in-depth investigation of Xeriscape as a water conservation measure. *J. Am. Water Works Assoc.* 98: 82-93.
- THIERS, B. Continuously updated. *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available in: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/> [Accessed: 20 Agosto 2022].
- TILLICH, H. J. 1995. Seedlings and systematics in monocotyledons. In: RUDALL, P. J., P. J. CRIBB, D. F. CUTLER & C. J. HUMPHRIES (eds.), *Monocotyledons: systematics and evolution*, pp. 303-352. Royal Botanic Gardens, Kew.
- TILLICH, H. J. 1996. Seeds and seedlings in Hanguanaceae and Flagellariaceae (Monocotyledons). *Senttnera* 3: 187-197.
- TILLICH, H. J. 1998. Development and organization. In: KUBITZKI, K. (ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 3, pp. 1-19. Springer, Berlin.
- TILLICH, H. J. 2000. Ancestral and derived character states in seedlings of monocotyledons. In: WILSON, K. L. & D. A. MORRISON (eds.), *Monocots: Systematics and evolution*, pp. 221-228. CSIRO, Melbourne.
- TILLICH, H. J. 2003a. Seedling diversity in Araceae and its systematic implications. *Feddes Repert.* 114: 454-487. <https://doi.org/10.1002/fedr.200311010>
- TILLICH, H. J. 2003b. Seedling morphology in Iridaceae: Indications for relationships within the family and to related families. *Flora: Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 198: 220-242.
<https://doi.org/10.1078/0367-2530-00094>
- TILLICH, H. J. 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Ann. Bot.* 100: 1413-1429.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm238>
- VALICENTI, R. O. & L. T. CACHENAUT. 2018. Cambios en la vegetación de un Flechillar a causa de la labranza de una franja cortafuegos. *RASADEP* 8: 17-26.

