



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Polinización cruzada entre dos especies
del género *Marathrum* (Podostemaceae)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A

Raúl Luna Ramos

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN



MÉXICO, D.F.

MAYO DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO

1. Luna
Ramos
Raúl
57160187
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
2. Doctora en Ciencias
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán
3. Doctor en Ciencias
Luis Alejandro
Novelo
Retana
4. Doctora en Ciencias
Sonia
Vázquez
Santana
5. Doctora en Ciencias
Margarita
Collazo
Ortega
6. Maestra en Ciencias
Karina
Jiménez
Durán
7. Polinización cruzada entre dos especies del género *Marathrum* (Podostemaceae)
40 páginas
2006

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo en Plantas, FC-UNAM, con el apoyo del Proyecto PAPIIT IN-215303 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA).

Dedico esta tesis a:

Mi familia, por haber confiado en mis decisiones y apoyarme para lograr mis metas. Gracias por su paciencia, cariño y dedicación.

A mis amigos, por todas las experiencias que hemos compartido. Gracias por estar siempre presentes. Soy fan de todos.

A los maestros que de alguna u otra forma han marcado mi camino. Gracias por compartir sus conocimientos.

Gracias a todos y a todo lo que ha influido en mí para ser la persona que soy hoy.

“...hay que convencerse de que la naturaleza siempre termina por imitar al arte”

Julio Cortázar

Agradezco

A la Dra. G. Judith Márquez Guzmán el haber dirigido este tema de investigación, por su apoyo a lo largo del mismo y por haber reforzado mi gusto en la botánica a través de sus clases.

Al jurado revisor: Dra. G. Judith Márquez Guzmán, Dr. L. Alejandro Novelo Retana, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Sonia Vázquez Santana y M. en C. Karina Jiménez Durán, por su colaboración en la mejora del presente manuscrito a través de sus valiosos consejos.

También a la Dra. Sonia Vázquez Santana por su ayuda en la aplicación de la técnica de azul de anilina en este trabajo y por su ayuda al realizar las observaciones al microscopio de epifluorescencia.

Al Dr. L. Alejandro Novelo Retana por compartir conmigo sus amplios conocimientos acerca de la familia Podostemaceae, por su valioso apoyo en el trabajo de campo y por participar activamente en la promoción de este trabajo y otros relacionados con esta interesante familia de plantas.

A Diana Guzmán Merodio por su gran ayuda en el trabajo de campo, por facilitarme todas las fotografías incluidas en este manuscrito, por su colaboración en el trabajo de laboratorio y por haber realizado la formación editorial del presente trabajo.

Al M. en C. Ricardo Wong y a la M. en C. María de Lourdes López Curto por el apoyo técnico brindado a lo largo de la realización de este trabajo.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena y a la Biól. Ana Isabel Bieler Antolín del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias por su apoyo en la toma de micrografías.

ÍNDICE

Resumen.....	7
Introducción.....	9
Antecedentes.....	11
Características generales de la familia Podostemaceae.....	11
Podostemáceas mexicanas.....	14
El género <i>Marathrum</i>	15
Problemática taxonómica del género <i>Marathrum</i>	18
Ecotipos.....	19
Sistemas de incompatibilidad reproductiva en angiospermas.....	19
Objetivos.....	21
Material y Método.....	23
Trabajo de campo.....	23
Pruebas de receptividad del estigma.....	24
Selección de flores.....	24
Pruebas de autoincompatibilidad.....	26
Polinizaciones cruzadas.....	27
Controles.....	28
Trabajo de laboratorio.....	28
Resultados.....	29
Receptividad estigmática.....	29
Cruzas intraespecíficas.....	29
Cruzas interespecíficas.....	30
Controles.....	32
Discusión.....	33
Conclusiones.....	35
Referencias.....	37

RESUMEN

La familia Podostemaceae es la más grande entre las angiospermas acuáticas estrictas. Existe una considerable falta de estudios con respecto a la naturaleza de los sistemas reproductivos en la familia, lo que limita la comprensión de la dinámica poblacional existente en estas plantas. *Marathrum* Humb. & Bonpl. está considerado como uno de los géneros Neotropicales con mayores dificultades taxonómicas. La variación morfológica entre poblaciones de *Marathrum* es sumamente alta, sin embargo, la delimitación de algunas especies como *Marathrum rubrum* Novelo & Philbrick y *Marathrum schiedeanum* (Cham.) Tul. sigue estando basada en caracteres morfológicos. Habiéndose planteado la posibilidad de que *M. rubrum* sea un ecotipo ambientalmente inducido de *M. schiedeanum*, surge la pregunta de si ambas especies son reproductivamente compatibles. Se llevaron a cabo polinizaciones ínterespecíficas, donde flores de *M. rubrum* fueron polinizadas con polen de *M. schiedeanum* y viceversa, previa emasculación y aislamiento de la flor receptora para prevenir polinización natural. La presencia de tubos polínicos en estigma y placenta fue confirmada en flores tratadas de ambas especies. Esta evidencia indica que no existen sistemas de incompatibilidad reproductiva actuando entre estas dos especies, por lo menos antes de que los tubos polínicos entren en contacto con el óvulo.

INTRODUCCIÓN

La familia Podostemaceae Rich. Ex C. Agardth (hierbas de río) se distribuye en las zonas tropicales del mundo, ocupando un hábitat sumamente peculiar. Estas plantas crecen adheridas al sustrato rocoso de ríos de corriente rápida y caídas de agua. La familia presenta graves problemas taxonómicos en todos los niveles, los cuales van desde la delimitación de subfamilias hasta el reconocimiento de especies. Estos problemas están asociados tanto con la particular morfología de las distintas especies de podostemáceas (consecuencia de las adaptaciones necesarias para sobrevivir en un hábitat tan extremo) como con la falta de colecciones que documenten la ocurrencia de dichas especies. También existe una significativa falta de estudios con respecto a la naturaleza de los sistemas reproductivos de la familia (incluyendo sistemas de incompatibilidad), lo que limita la comprensión de la dinámica poblacional existente en podostemáceas. *Marathrum* Humb. & Bonpl., está considerado como uno de los géneros de distribución neotropical con mayores dificultades taxonómicas por problemas de delimitación genérica y subgenérica. La variación morfológica entre poblaciones de *Marathrum* es sumamente alta; sin embargo, la delimitación de algunas especies sigue estando basada en caracteres morfológicos. *Marathrum rubrum* Novelo & Philbrick es un claro ejemplo de este criterio de delimitación específica. *Marathrum rubrum* y *M. schiedeanum* (Cham.) Tul., son especies que se encuentran diferenciadas exclusivamente por caracteres morfológicos presentes en las hojas, habiéndose planteado la posibilidad de que *M. rubrum* sea un ecotipo ambientalmente inducido de *M. schiedeanum*. Es, en este contexto, donde surge la pregunta de si ambas especies son reproductivamente compatibles como una primera aproximación para la resolución del problema de si *M. rubrum* y *M. schiedeanum* son o no una misma especie. Para tal efecto se llevaron a cabo polinizaciones interespecíficas entre *M. rubrum* y *M. schiedeanum*; flores de *M. rubrum* fueron polinizadas con polen de *M. schiedeanum* y viceversa, previa emasculación y aislamiento de la flor receptora para prevenir polinización natural. Las plantas, cuyas flores fueron polinizadas en el campo, se llevaron al laboratorio y se trataron con el fin de detectar la presencia de tubos polínicos en estigmas y ovario. El presente estudio constituye un aporte al conocimiento de la naturaleza de los sistemas reproductivos en *Marathrum* y una aproximación a la problemática taxonómica de este grupo de podostemáceas.

ANTECEDENTES

Características generales de la familia Podostemaceae

La familia Podostemaceae Rich. ex C. Agardth (Magnoliopsida) está considerada como la más grande y diversa dentro de las angiospermas acuáticas estrictas; presenta cerca de 270 especies asignadas a 48 géneros, en su mayoría monotípicos (Cook, 1990). Los géneros de esta familia se encuentran normalmente clasificados en dos subfamilias: Podostemoideae y Tristichoideae (incluyendo a *Weddellina squamulosa* Tul.; van Royen, 1951, 1953). Sin embargo, estudios recientes (Jäger-Zürn, 1997; Rutishauser, 1997; Kita y Kato, 2001) apoyan la clasificación originalmente propuesta por Engler en 1930, en la cual se reconocen las dos subfamilias antes mencionadas junto con la tercer subfamilia Weddellinoideae (Rutishauser, 1997). La posición taxonómica de la familia en el interior de las angiospermas no se encuentra bien determinada debido a una gran cantidad de modificaciones adaptativas que han opacado e inclusive eliminado características taxonómicas útiles (Les *et al.*, 1997). A esto se suma la hipótesis de que los rasgos presentes en esta familia pudieran no ser explicados en términos adaptativos (Willis, 1902, en Rutishauser, 1997). Los intentos por establecer filogenias moleculares no han arrojado resultados claros con respecto a las relaciones taxonómicas de este grupo con el resto de las angiospermas (Les *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1997; Soltis *et al.*, 1999; Kita y Kato, 2001).

Las especies de esta familia se encuentran distribuidas en ríos de corriente rápida en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Representantes de esta familia se pueden encontrar en el este de Asia, el noreste de Australia, Nueva Guinea, África central, Madagascar y América (Cook, 1990). En América las podostemáceas se distribuyen desde México hasta el noreste de Argentina, a excepción de *Podostemum ceratophyllum* Michx., que al ser una especie de clima templado, se encuentra representada en latitudes mas elevadas, que van desde el sureste de Canadá hasta el sur de Estados Unidos (Philbrick y Novelo, 1995). El 60% (ca. 160 spp.) de las especies de la familia, representando 20 géneros, se distribuye en el Nuevo Mundo (Philbrick y Novelo, 2004). De estas especies, cerca de 70% se agrupa en cuatro géneros, todos pertenecientes a la subfamilia Podostemoideae. Estos géneros son: *Apinagia* Tul. con 50 especies, *Marathrum* Humb. & Bonpl. con 25 especies, *Rhyncholacis* Tul. con 25 especies (Philbrick y Novelo, 1995) y *Podostemum* Michx. con 11 especies (Philbrick y Novelo, 2001, 2004).

El hábitat característico de las podostemáceas es sumamente peculiar ya que se encuentran restringidas a las corrientes rápidas de ciertos ríos, así como a caídas de agua, en las cuales el rango de temperatura es de 14 a 27⁰ C, y alcanzan profundidades de hasta 100 cm (Sculthorpe, 1967). Las únicas angiospermas con un hábitat similar se encuentran en la familia africana

Hydrostachyaceae Engl., la cual presenta una diversidad y distribución mucho menor a la de las Podostemaceae (Cusset, 1973a, en Philbrick y Novelo, 1995).

Las podostemáceas presentan una fuerte adherencia al sustrato rocoso gracias a la presencia de pelos adhesivos unicelulares (rizoides) expuestos a la acción secretora de un polisacárido producido por cianobacterias que se establecen en el mismo sustrato (Jäger-Zürn y Grubert, 2000). Con base en su adherencia al sustrato rocoso, las podostemáceas se pueden considerar como haptofitas (plantas que se encuentran adheridas a, pero no penetran, el sustrato) de acuerdo con la clasificación de plantas hidrófitas de Luther (1949), categoría que comparten con muchas algas, líquenes y briofitas (Sculthorpe, 1967).

Las corrientes rápidas pueden ser las zonas más productivas de los ríos (Horne y Goldman, 1994). Dado que las podostemáceas son las macrófitas dominantes en corrientes rápidas y caídas de agua de ríos tropicales, resulta factible pensar (ya que no existen estudios suficientes) que desempeñan un papel central en la ecología de estos cuerpos de agua, siendo directamente responsables de la alteración de corrientes superficiales, de la generación de refugios, fuentes de alimento y zonas de apareamiento para la biota, además de contribuir con el sistema lótico como fuente de carbono autóctona (Philbrick y Novelo, 1995; Quiroz *et al.*, 1997). Se ha informado que algunas especies pueden ser fundamentales para la dieta de algunos peces (van Royen, 1951; Torres-Navarro y Lyons, 1999; Pagezy y Jégu, 2002; Marcineck *et al.*, 2003). También se han llevado a cabo estudios de cómo se relacionan las poblaciones de podostemáceas con algunas especies de invertebrados, a quienes sirven de alimento y hábitat (Hutchens *et al.*, 2003).

Las podostemáceas se encuentran comúnmente en ríos oligotróficos (con baja cantidad de nutrientes), pero algunas especies son capaces de soportar niveles de contaminación considerables, en especial en la época de secas, cuando el río se encuentra bajo, aunque no se ha precisado si estas plantas pueden vivir con este tipo de estrés por periodos prolongados (Quiroz *et al.*, 1997).

El cuerpo vegetativo de las podostemáceas está sumamente modificado con respecto a otras plantas vasculares; algunas especies pueden ser fácilmente confundidas con organismos tan diversos como líquenes, algas, musgos o briofitas cuando no se encuentran en etapa reproductiva (Sculthorpe, 1967; Ueda *et al.*, 1997). Su morfología es sumamente variable y exhibe normalmente un cuerpo vegetativo taloide producto de la compresión dorsiventral de raíces, tallos o el conjunto de éstos (Sculthorpe, 1967; Rutishauser, 1997). Las hojas pueden ser complejas y de hasta dos metros de longitud, como en el caso de *Mourera* Aubl., o, por el contrario, verse reducidas a escamas compuestas por una sola capa celular, como sucede con *Tristicha* Du Petit-Thouars, cuyas hojas miden no más de dos milímetros de longitud (Rutishauser, 1997). Otras características anatómicas distintivas del cuerpo vegetativo de las podostemáceas son la falta de aerénquima,

y la presencia de cuerpos de sílice en las células epidérmicas (Sculthorpe, 1967), así como la presencia de tubos laticíferos en algunos taxa (Grubert, 1974).

Las podostemáceas presentan un ciclo de vida muy particular; los órganos vegetativos de la planta madura se encuentran sumergidos, anclados al sustrato rocoso, y presentan un máximo desarrollo vegetativo durante la temporada de lluvias. Al bajar el nivel del agua durante la estación seca, la mayoría de las hojas maduras se pierde, pudiendo llegar a producirse hojas secundarias con apariencia muy diferente a las hojas completamente sumergidas (Philbrick y Novelo, 1995). La fase gametofítica del ciclo de vida se inicia con el cuerpo vegetativo sumergido, ya que las flores se forman dentro del talo de las plantas (Murguía-Sánchez *et al.*, 2001; Schnell, 1967, en Murguía-Sánchez, 2003). Una vez que los ríos en que habitan alcanzan un nivel lo suficientemente bajo comienza el proceso de floración (Mohan Ram y Sehgal, 1992). Los botones florales que se encuentran inmersos en el tallo de la planta salen a la superficie por la elongación de los pedicelos, lo que nos da como resultado una antesis aérea (Philbrick y Novelo, 1993).

Las flores de las podostemáceas son hermafroditas y la familia se caracteriza por presentar reducción floral, así como una disminución, en general, del número de órganos por verticilo y la ausencia de ciertos verticilos. El perianto suele estar sumamente reducido o ausente; los estambres se encuentran asociados con tépalos pequeños; hay presencia de un solo pistilo, pero el número de estigmas puede variar; las flores son generalmente casmógamas (aunque la ocurrencia de cleistogamia ha sido reportada en la familia, Khosla *et al.*, 2001). En la subfamilia Podostemoideae los botones florales se encuentran cubiertos individualmente por una estructura tubular denominada espátela, la cual podría ser homóloga (en la mayoría de las especies de la subfamilia) a dos hojas que se presentan unidas gracias a un crecimiento interprimordial temprano (Rutishauser, 1997). El incremento en el tamaño del botón floral y la elongación del pedicelo llevan a la ruptura de la espátela (Cook, 1990).

La antesis se presenta cuando hay un descenso del nivel del agua (Philbrick y Novelo, 1993), después de lo cual se presenta la fecundación. Los frutos se desarrollan fuera del agua una vez que la parte vegetativa asociada con los mismos se ha secado (Philbrick y Novelo, 1994). La reproducción sexual es fundamental para la familia (Philbrick y Novelo, 1995), lo cual contrasta con el patrón encontrado en las angiospermas acuáticas, cuyo principal medio de reproducción es por vía asexual (Sculthorpe, 1967). La predominancia de la reproducción sexual favorece la recombinación génica y por lo tanto promueve la variación al interior de las poblaciones (Grant, 1989), esto podría estar jugando un papel fundamental con respecto al gran número de taxa presente en las podostemáceas, sin embargo, la falta de estudios sobre características poblacionales, taxonomía y filogenia hacen imposible corroborar esta hipótesis (Philbrick y Novelo, 1997).

En la familia se encuentra una tendencia floral marcada a la

zigomorfa, lo cual puede implicar el reemplazo de la entomofilia por la anemofilia (Sculthorpe, 1967). Aunque la anemofilia parece tener gran importancia para la familia, se ha documentado autopolinización e incluso cleistogamia en varios miembros de Podostemoideae (Philbrick y Novelo, 1998; Khosla *et al.*, 2000). La diversidad de síndromes de polinización es evidente, aunque hacen falta estudios para determinarlos de manera precisa en la mayoría de las especies (Philbrick y Novelo, 1998).

El patrón de desarrollo embriológico de las podostemáceas difiere de forma significativa del común en angiospermas (Jäger-Zürn, 1997), y es de particular interés la presencia de sacos embrionarios de origen tetracelular (Battaglia, 1987; Jäger-Zürn, 1997, Murguía-Sánchez *et al.*, 2002) y de un plasmodio nuclear o pseudosaco embrionario que se desarrolla a partir de la nucela (Arekal y Nagendran, 1975), así como la ausencia de endospermo, lo cual se ha adjudicado frecuentemente (aunque sin pruebas suficientes) a la ausencia del proceso de doble fecundación (Kapil, 1970, en Raghavan, 2003).

Podostemáceas mexicanas

En México se encuentran identificados cinco géneros y ocho especies de la familia Podostemaceae: *Oserya* Tul. & Wedd. con dos especies, ambas endémicas; *Marathrum* con tres especies, una de las cuales es endémica; *Podostemum* con una sola especie; *Tristicha* y *Vanroyenella* Novelo & Philbrick son monoespecíficos, siendo este último endémico de México (Novelo y Philbrick, 1997). En algunos ríos, como el Horcones, en Jalisco, se presentan hasta cuatro especies distintas, que corresponden a cuatro diferentes géneros: *Marathrum*, *Oserya*, *Tristicha* y *Vanroyenella* (Novelo y Philbrick, 1997).

Las podostemáceas mexicanas se encuentran distribuidas en tres tipos de climas, según la clasificación de Köeppen (1948) y García (1988): climas calientes y húmedos, denominados A; climas secos, denotados como B; y climas templados húmedos, denominados como C. El clima de tipo Aw (que tiene una amplia temporada de secas) alberga a los cinco géneros de podostemáceas mexicanas; el clima de tipo Am (temporada de secas reducida) alberga especies de *Marathrum*, *Podostemum* y *Tristicha*; el clima Af (lluvias todo el año) alberga especies de *Marathrum*, *Podostemum* y *Tristicha*; sin embargo, éstas se distribuyen en muy pocas localidades; en el clima BW (muy árido) se encuentran pocas localidades que contienen la especie *Oserya coulteriana* Tul.; en el clima BS (árido) se encuentran representadas especies de *Oserya*, *Podostemum* y *Tristicha*; en el clima Cw (de lluvias en verano) se encuentran especies de *Marathrum*, *Oserya*, *Podostemum* y *Tristicha* (Novelo y Philbrick, 1997).

Las podostemáceas mexicanas se pueden ubicar principalmente en ocho provincias fisiográficas, según la clasificación de Rzedowski (1988),

las cuales corresponden a la planicie costera noroccidental, la Sierra Madre Oriental, el eje volcánico transversal, la planicie costera nororiental, la depresión del Balsas, la Sierra Madre del Sur, el sistema montañoso de la región norte de Oaxaca y la planicie costera suroriental (Novelo y Philbrick, 1997).

El género *Marathrum*

Marathrum es un género americano conformado por cerca de 25 especies que se distribuyen en México, América Central y en porciones noroccidentales de Sudamérica y las Antillas (van Royen, 1951). Este género posee especies anuales y perennes (Murguía-Sánchez, 2003). Son hierbas pequeñas o grandes, postradas, aplanadas, con raíces alargadas. Tienen un talo postrado, alargado y grueso. Hojas alternas, pecíolo cilíndrico o ligeramente comprimido, lámina pinnada, repetidamente bifurcada o subentera con unos pocos lóbulos a lo largo del margen, pinnas primarias alternas o subopuestas, las divisiones posteriores capiliformes, filiformes o espatuladas. Flores hermafroditas, actinomorfas o zigomorfas, pediceladas que surgen axilarmente entre la base de las hojas, solitarias o en fascículos, cubiertas por una espatela en forma de saco. La espatela es clavada. Los pedicelos se alargan durante y después de la antesis, con o sin un ápice expandido formando una estructura en forma de copa en torno a la base de la cápsula. Presenta de tres a 10 tépalos con apariencia de escamas, alternos con los estambres. Presenta de dos a 11 estambres, libres, en un verticilo que circunda el pistilo o sobre un lado del mismo; son deciduos, las anteras son basifijas, con dehiscencia introrsa o latrorsa. El polen se libera en mónadas. El ovario es bilocular. No presenta estilo. Tiene dos estigmas libres o basalmente fusionados, cónicos. Los óvulos son numerosos con placentación axilar. Las cápsulas son biloculares, con valvas iguales, persistentes, cada una con tres o cuatro costillas, y márgenes de la sutura engrosados. Contiene semillas numerosas (Novelo y Philbrick, 1997).

En México se encuentran tres especies de *Marathrum*: *M. rubrum* Novelo & Philbrick, *M. schiedeanum* (Cham.) Tul. y *M. tenue* Liebm. Estas especies se encuentran creciendo generalmente con *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng. *Marathrum tenue* está comúnmente asociada con *Podostemum rutifolium* subsp. *ricciiforme* (Liebm.) Novelo & C. T. Philbrick, mientras que *M. schiedeanum* se encuentra frecuentemente junto con *Oserya coulteriana* y *Vanroyenella plumosa* Novelo & Philbrick (Novelo y Philbrick, 1997). Este trabajo se encuentra inmerso en la problemática taxonómica existente entre *M. rubrum* y *M. schiedeanum* (Rutishauser, 1997), mismas que serán descritas brevemente a continuación.

Marathrum rubrum (figura 1) es una hierba perenne; presenta raíces elongadas, postradas y aplanadas, de alrededor de un milímetro de diámetro; los peciolos son cilíndricos, ligeramente aplanados; la hoja tiene un raquis central expandido

y prominente, pinnado repetidamente. La pinnación primaria suele ser alterna, mientras que las divisiones subsecuentes son capilosas, de 1.2 a 4.5 mm de largo y de 0.02 a 0.06 mm de ancho, el ápice es agudo; los pedicelos van de 3 a 5.5 cm de largo y presentan un ápice expandido en forma de copa alrededor de la base de la cápsula. Este ápice mide entre 1.5 y 2 mm de diámetro y presenta un borde irregular; tiene entre siete y nueve tépalos, de 0.5 a 0.9 mm de largo, y triangulares, insertados de forma alternada con los estambres. Presenta de siete a nueve estambres, insertados en un anillo que rodea el pistilo; los filamentos van de 2.3 a 4 mm de largo; las anteras, de 1.5 a 2.8 mm de largo; los estigmas, de 0.6 a 1.5 mm de largo; las cápsulas, de 4.5 a 5 mm de largo y de 1.7 a 2.2 mm de diámetro; cada valva presenta tres costillas; la media de semillas por cápsula es de 676 (SD 296, n=29) (Novelo y Philbrick, 1993).

El carácter distintivo de *M. rubrum* se encuentra en sus hojas, ya que es la única especie que presenta divisiones capiliformes. El color rojo de las hojas se evidencia tanto en la superficie adaxial como en la abaxial; otras especies de *Marathrum* presentan esta coloración únicamente en la superficie abaxial de las hojas (Novelo y Philbrick, 1993).

Marathrum rubrum es endémica de las partes bajas de la costa del Pacífico de México (figura 3). Ha sido recolectada solo en algunos ríos de Jalisco y Guerrero, donde puede encontrarse junto con *O. coulteriana*, *T. trifaria* y *V. plumosa* (Novelo y Philbrick, 1993).

Figura 1. Fotografía de *Marathrum rubrum* en la que se aprecia la parte vegetativa de la planta. Se puede observar claramente el color rojo característico de las hojas de esta especie. Río Los Horcones, Jalisco. Noviembre de 2004



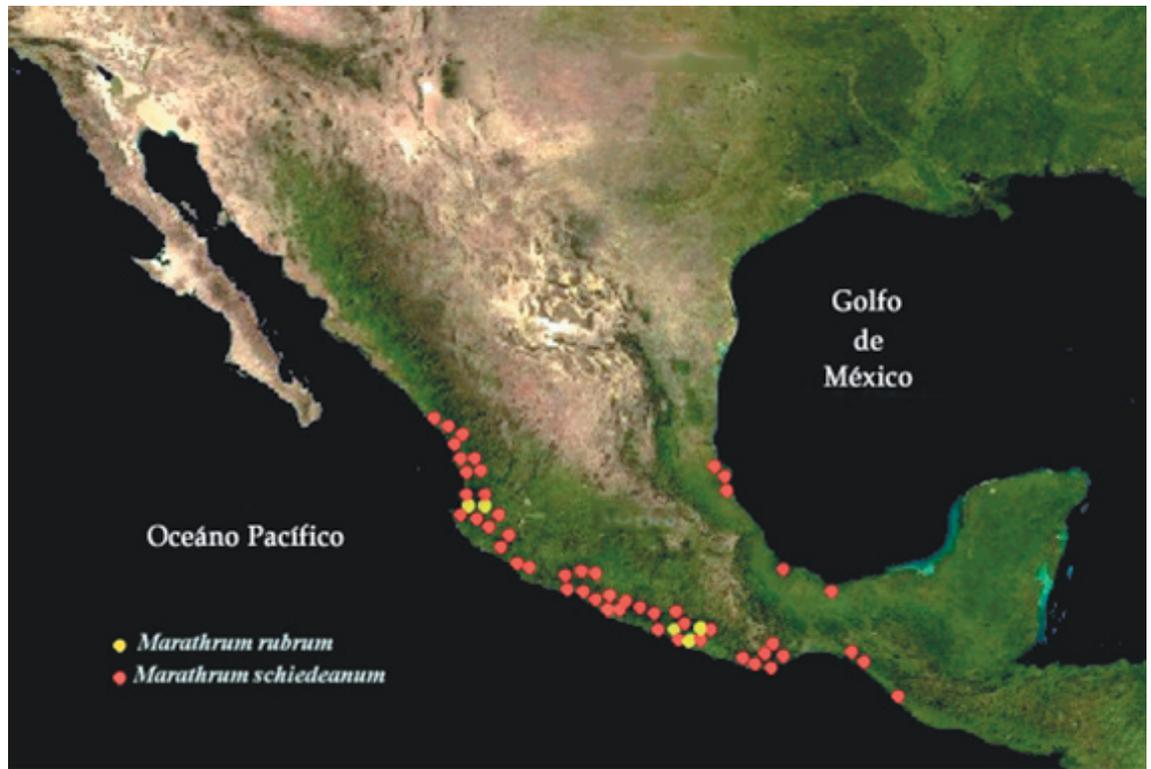
Marathrum schiedeanaum (figura 2) es una planta anual o perenne (*sic*); el tallo llega a medir hasta 20 cm de largo, algunas veces se encuentra ramificado, postrado o aplanado, con hasta 2.5 cm de diámetro; las hojas son verdes, pero frecuentemente se puede observar un color rojizo en la superficie abaxial; miden hasta 80 cm de largo; los peciolos van de cilíndricos a ligeramente aplanados; la hoja tiene un raquis central expandido y prominente, pinnado, dividido repetidamente; la pinnación primaria es comúnmente alterna, las divisiones posteriores pueden ser filiformes o espatuladas, de dos a cuatro milímetros de largo y de 0.18 a 0.6 mm de ancho; el ápice es agudo. Los pedicelos van de cuatro a 10 cm de largo con un ápice expandido en forma de copa alrededor de la base de la cápsula; este ápice va de 1.3 a tres mm de diámetro, con un borde que puede ser liso o irregularmente dentado. Presentan de seis a 10 tépalos, que van de 0.4 a 1 mm de largo, triangulares, insertados alternadamente con los estambres, que son de siete a nueve, insertados en un anillo que rodea el pistilo. Los filamentos van de 3.8 a 6.5 mm de largo; las anteras, de 1.4 a 2.8 mm de largo; los estigmas, de 0.1 a 1.5 mm de largo; las cápsulas, de cuatro a seis mm de largo y de 1.7 a 2.5 mm de diámetro. Cada valva presenta tres costillas; la media de semillas por cápsula es de 392 (SD 279, n=76; Novelo y Philbrick, 1997).

Marathrum schiedeanaum tiene una amplia distribución en las zonas bajas de México (por debajo de los 1,000 msnm), de Nayarit a Chiapas en la costa del Pacífico y en Veracruz, en la del Atlántico (figura 3). *M. schiedeanaum* se distribuye igualmente en Guatemala, Belice y Costa Rica (Novelo y Philbrick, 1997).



Figura 2. Fotografía de *Marathrum schiedeanaum* en la que se aprecia la parte vegetativa de la planta. Río Las Juntas, Jalisco. Noviembre de 2005.

Figura 3. Mapa de la República Mexicana, donde se muestra de forma comparativa la distribución de *M. rubrum* (en color amarillo) y *M. schiedeanum* (en color rojo) basado en las colecciones de van Royen y Novelo & Philbrick. Modificado de Novelo y Philbrick, 1997.



Una característica destacable con respecto a la distribución de estas especies es la presencia de una sola especie residente por río (Philbrick y Novelo, 1995). Un claro ejemplo de este fenómeno se presenta en los ríos Horcones y Los Veranos, en Jalisco donde *M. rubrum* se presenta en Horcones y *M. schiedeanum* en Los Veranos, y sólo *M. rubrum* se encuentra presente después de que ambos ríos confluyen.

Oropeza *et al.* (1998) realizaron el primer análisis cariomorfológico en especies de *Marathrum*, demostrando que el número cromosómico de *M. rubrum* y *M. schiedeanum* es de $2n_{28}$. Estos mismos estudios demostraron que en *M. rubrum* los 14 pares cromosómicos son metacéntricos (los centrómeros se encuentran localizados en la parte central de los cromosomas), mientras que en *M. schiedeanum* existen 11 pares metacéntricos y tres pares submetacéntricos (los centrómeros se encuentran cerca del centro del cromosoma, de manera que un brazo es ligeramente mas corto que el otro).

Problemática taxonómica del género *Marathrum*

A pesar de los esfuerzos por aumentar el conocimiento con respecto a los géneros americanos de la familia Podostemaceae realizados por van Royen (1951, 1953, 1954), *Marathrum* continúa siendo uno de los grupos con mayores problemas

taxonómicos (Rutishauser, 1997). Novelo y Philbrick (1997) reconocen el complejo *M. schiedeanum*, tratando como una sola especie a tres especies propuestas por van Royen en 1951 (*M. elegans* P. Royen, *M. haenkeanum* Engl. y *M. schiedeanum*), ya que estas plantas exhiben una variación fenotípica considerable, que hace difícil su distinción, además de existir una gran variabilidad entre poblaciones. Este complejo deja fuera a *M. rubrum*, especie que según Rutishauser (1997) y Philbrick y Novelo (1995) podría representar un ecotipo ambientalmente inducido; sin embargo, no existe evidencia de los factores que regulan los ecotipos en cada río. La ocurrencia de un alto endemismo en la familia, incluyendo el fenómeno de residencia observado entre *M. rubrum* y *M. schiedeanum*, puede ser resultado de la combinación de factores bióticos y abióticos que imperan entre las poblaciones de *Marathrum*. No obstante no se han determinado las causas específicas que determinan la particular distribución de estas especies (Philbrick y Novelo, 1995).

Es necesario llevar a cabo estudios que revelen la naturaleza de los sistemas reproductivos en *Marathrum* para comprender mejor la dinámica de las barreras reproductivas que puedan existir entre las especies del género. Los estudios de compatibilidad son una herramienta clave en este sentido, pues evidencian el grado de aislamiento reproductivo que existe entre las diversas especies, condición fundamental en la definición de especie biológica (Grant, 1989; Spichiger *et al.*, 2004).

Ecotipos

Los ecotipos constituyen una categoría biosistemática basada en relaciones de fertilidad (Grant, 1989). Un ecotipo consiste en todos los miembros de una determinada especie adaptados para sobrevivir en un ambiente particular dentro de un área total de distribución; dos o más ecotipos son capaces de intercambiar genes de forma libre, sin que exista pérdida de fertilidad o vigor en la progenie (Clausen, *et al.*, 1945, en Grant, 1989).

En un grupo de plantas determinado una categoría biosistemática como el ecotipo se igualaría, en términos de unidades poblacionales, a una raza local. Las razas locales son poblaciones o sistemas poblacionales que, aun estando dentro de una misma especie, difieren de manera significativa, en lo correspondiente a su acervo genético y a algunos caracteres fenotípicos, de otros sistemas poblacionales de la misma especie; esta diferenciación se debe a la interacción de factores como el flujo génico, la selección natural y la deriva génica (Grant, 1989).

Sistemas de incompatibilidad reproductiva en angiospermas

Las angiospermas han desarrollado una gran variedad de estrategias para impedir la polinización por parte de polen no deseado. Estas estrategias pueden ocurrir a

distintos niveles, por ejemplo, en la adherencia del grano de polen al tejido receptivo del estigma, en la hidratación del polen o en la germinación y crecimiento del tubo polínico (Bedinger, *et al.*, 1994). El polen puede ser rechazado por provenir de la misma planta (rechazo intraespecífico o autoincompatibilidad) o por pertenecer a otra especie (rechazo interespecífico o incompatibilidad cruzada) (Cruz *et al.*, 2001).

La autoincompatibilidad es un mecanismo fisiológico con bases genéticas que promueve el entrecruzamiento (Liedl y Anderson, 1993). Esta barrera previa a la fecundación inhibe o retarda la germinación del grano de polen o el crecimiento del tubo polínico mediante el reconocimiento específico entre polen y estigma (Ascher, 1976). Comúnmente es un único locus *S* (self incompatible) el responsable de codificar estas determinantes específicas a partir de una variedad de alelos (East y Mangelsdorf, 1925, en Liedl y Anderson, 1993). Los alelos que generan esta especificidad pueden provenir del grano de polen (incompatibilidad gametofítica) o pueden derivarse del genoma diploide del esporofito (incompatibilidad esporofítica). Cuando las plantas con diferentes genotipos relacionados con la incompatibilidad presentan flores con una misma morfología se habla de un sistema de autoincompatibilidad homomórfica; cuando los cambios en la morfología floral se relacionan con tipos incompatibles se habla de un sistema de autoincompatibilidad heteromórfica (Liedl y Anderson, 1993).

La incompatibilidad cruzada puede afectar tanto los procesos previos como los posteriores a la fecundación (Raghavan, 1997). Cuando un sistema de autoincompatibilidad se encuentra actuando en alguna de las dos especies, previniendo el correcto desarrollo de tubos polínicos, el fenómeno se denomina incompatibilidad interespecífica (Liedl y Anderson, 1993). Las alteraciones posteriores a la fecundación causan efectos más drásticos, como pueden ser el arresto en el desarrollo del embrión o del endospermo (Raghavan, 1997). La incompatibilidad cruzada constituye una incongruencia, lo cual puede definirse como las barreras reproductivas pre o postcigóticas provocadas por el aislamiento de taxa (Liedl y Anderson, 1993).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si existen sistemas de incompatibilidad que impidan la germinación del grano de polen y el correcto desarrollo de tubos polínicos en polinizaciones cruzadas entre *Marathrum rubrum* y *Marathrum schiedeanum*.

Objetivos particulares

- Establecer, para ambas especies, el momento en el desarrollo de la flor en el que el estigma se encuentra receptivo.
- Determinar si existen barreras de autoincompatibilidad en la misma especie.
- Determinar si existe incompatibilidad interespecífica entre *Marathrum rubrum* y *Marathrum schiedeanum*.

METODOLOGÍA

TRABAJO DE CAMPO

Se trabajó con dos especies del género *Marathrum* (Podostemaceae): *M. rubrum* y *M. schiedeanum*. El trabajo de campo se llevó a cabo del 17 al 21 de marzo de 2004, del 25 de noviembre al 3 de diciembre de 2004 y del 25 al 28 de febrero de 2005 en dos ríos de fuerte corriente en Jalisco, México (figuras 4.1 y 4.2). Los ejemplares de referencia se encuentran depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU). El sitio de estudio para *M. rubrum* se localiza en el río Los Horcones, municipio de Cabo Corrientes, Jalisco ($20^{\circ} 27' 45'' N, 105^{\circ} 17' 30'' O$), 27 km al sur de Puerto Vallarta rumbo a Chamela, a una altitud de 350 msnm. Ejemplares de referencia: *Novelo & Téllez 982* (MEXU); *Novelo & Philbrick 1035* (MEXU); *Novelo & Téllez 979* (MEXU). El sitio de estudio para *M. schiedeanum* se localiza en el río Las Juntas, municipio de Cabo Corrientes, Jalisco ($20^{\circ} 29' 00'' N, 105^{\circ} 17' 35'' O$) 10 km al sur de El Tuito, rumbo a Chamela, a una altitud de 300 msnm. Ejemplares de referencia: *Novelo & Téllez 986* (MEXU). Ambos ríos son oligotróficos con bajo nivel de contaminación (Quiroz, *et al.*, 1997).

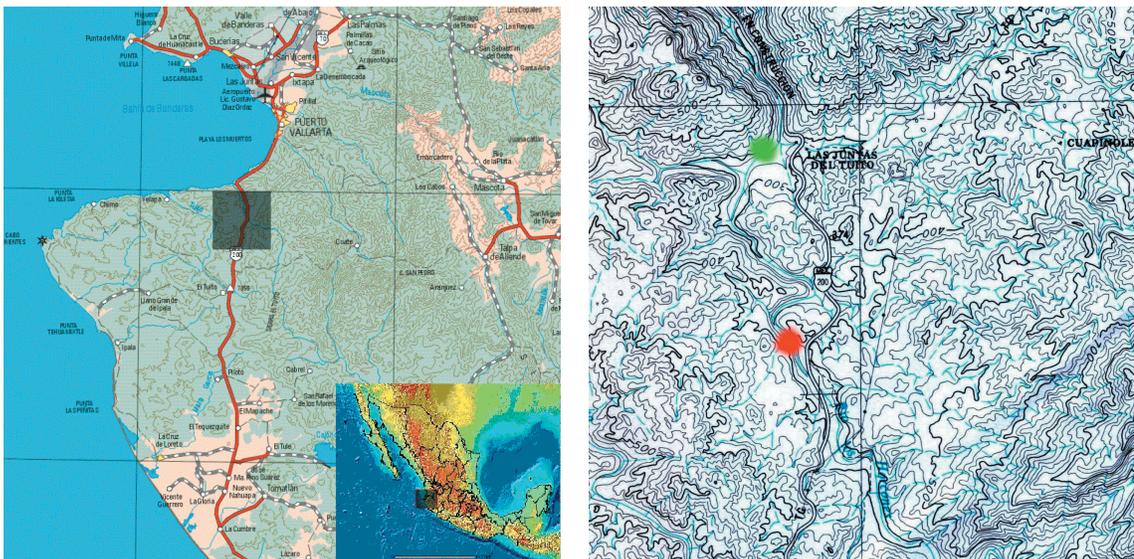


Figura 4.1 Mapa del estado de Jalisco donde se aprecia la localización del municipio de Cabo Corrientes. La zona de estudio se encuentra identificada por un recuadro negro amplificado en la figura 4.2. En la esquina inferior derecha se presenta un mapa de la República Mexicana donde se señala en un recuadro negro la zona del Estado de Jalisco. Figura 4.2 Zona de estudio: en rojo se señala la zona en la que se trabajó con *M. rubrum* en el río Los Horcones y en verde la zona correspondiente a *M. schiedeanum* en el río Las Juntas.

Pruebas de receptividad del estigma

Las pruebas de receptividad del estigma se realizaron en fresco, según el procedimiento descrito por Zeisler (1938), exponiendo los estigmas por un periodo aproximado de un minuto a una solución de peróxido de hidrógeno al 6%, estableciendo como reacción positiva el burbujeo presente en la superficie estigmática resultado de la reacción del peróxido de hidrógeno con enzimas de tipo peroxidasa (Kearns e Inouye, 1993). Esta prueba se aplicó a flores en las cinco etapas morfológicas descritas por Guzmán-Merodio para *M. rubrum* (Guzmán-Merodio *et al.*, 2005) (tabla 1, figura 5). Estas etapas se extrapolaron a las flores de *M. schiedeana*, ya que presentan un patrón de desarrollo morfológico equivalente al presente en *M. rubrum*. Para cada una de las cinco etapas se realizaron 20 repeticiones en cada una de las especies, teniendo un total de 100 pruebas por especie.

Tabla 1. Descripción de las etapas identificadas con base en los cambios de la morfología de estambres y estigmas a lo largo del desarrollo de la flor de *M. rubrum*. (Guzmán-Merodio *et al.*, 2005).

	Morfología de los estambres	Morfología de los estigmas
Etapa 1	Dentro de la espátela / Anteras en forma de flecha	Coloración púrpura / Cerrados
Etapa 2	Ápice de las anteras fuera de la espátela/ Anteras en forma de flecha con coloración magenta	Coloración púrpura / Cerrados
Etapa 3	Estambres totalmente fuera de la espátela / Los estambres se encuentran adheridos al ovario / Anteras en forma de flecha con coloración magenta	Coloración púrpura / Cerrados
Etapa 4	Las anteras adquieren una posición perpendicular con respecto al filamento / Los estambres se separan del ovario / El polen se encuentra expuesto	Coloración púrpura / Separados
Etapa 5	Las anteras adquieren una coloración café y después degeneran	Coloración café / Separados

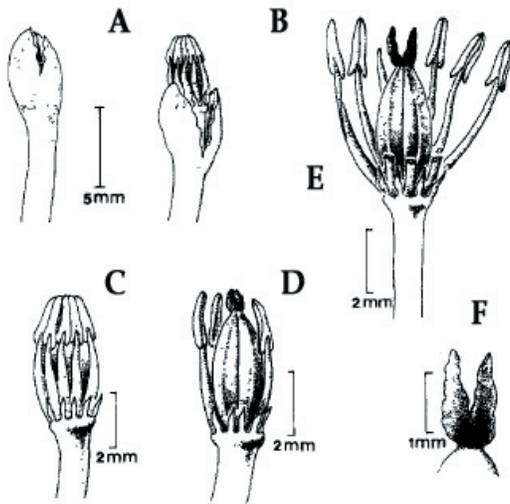


Figura 5. Ilustraciones de los cambios morfológicos presentes durante el desarrollo de las estructuras reproductivas de *Marathrum rubrum*, en correspondencia con las etapas establecidas por Guzmán-Merodio (2005). (A) Botón floral al momento de la ruptura de la espata (etapa 1); (B) Flor con el ápice por fuera de la espata (etapa 2); (C) Flor totalmente fuera de la espata, las anteras aún no se encuentran dehiscentes (etapa 3); (D) Flor en etapa 3; se aprecian claramente los estigmas, los cuales aún se encuentran juntos; (E) Flor al momento de la dehiscencia de las anteras; los estigmas se encuentran separados y receptivos (etapa 4); (F) Detalle de los estigmas durante la etapa 4. (Modificada de Novelo y Philbrick, 1993).

Selección de flores

Las polinizaciones cruzadas se llevaron a cabo en marzo y noviembre de 2004, seleccionando flores cuyo estigma no se encontrara receptivo al momento de iniciar el tratamiento. Estas flores fueron emasculadas y aisladas para prevenir la polinización (figura 6). La emasculación se realizó manualmente, con la ayuda de pinzas de relojero. El aislamiento consistió en cubrir las flores con membranas de diálisis, las cuales fueron cortadas para acoplarse al tamaño de las flores; estas membranas fueron amarradas con hilo por un extremo para después ser colocadas alrededor de las flores (a manera de capucha), siendo amarradas al pedicelo por el otro extremo, teniendo cuidado de ajustarlas sin lastimar el pedicelo, para evitar interferencia con el desarrollo de la flor. Todas las bolsas fueron amarradas con hilos de algodón o nylon.

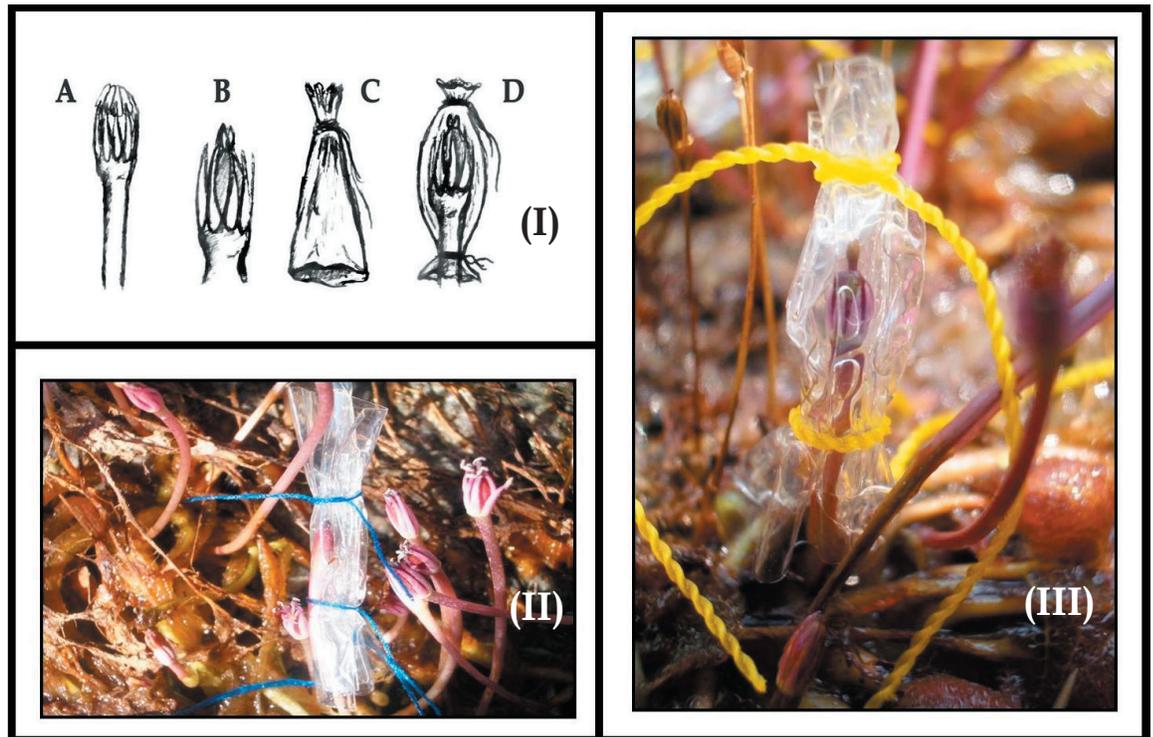


Figura 6. (I) Diagrama del proceso de emasculación y aislamiento de flores de *Marathrum*. (A) Flor con estigma no receptivo; (B) Flor de la cual se le han removido las anteras; (C) Membrana de diálisis amarrada por la parte superior dejando libre la parte inferior para ser colocada sobre la flor; (D) Flor emasculada dentro de la membrana de diálisis, asegurada por la parte inferior a través de un hilo sujeto al pedicelo. (II) Flor de *M. rubrum* emasculada y aislada. (III) Flor de *M. schiedeanum* emasculada y aislada.

Pruebas de autoincompatibilidad

Para establecer la presencia de barreras de autoincompatibilidad en la misma especie se seleccionaron 10 flores de cada especie cuyo estigma no se encontrara receptivo al momento de iniciar el tratamiento. Estas flores fueron embolsadas sin emascular, previniendo la presencia de polen que no viniera de la misma flor en los estigmas. La colecta de estas flores se realizó 48 horas después de iniciado el tratamiento, una vez que los estigmas se encontraban receptivos y las anteras estaban dehiscentes.

Polinizaciones cruzadas

Las flores aisladas y emasculadas fueron polinizadas con el polen de la especie contraria, al tiempo que el estigma se encontraba receptivo. Para este fin se recolectaron plantas de ambas especies con abundantes flores, las cuales servirían como donadoras de polen; estas plantas se colectaron un día antes de realizar las polinizaciones y fueron mantenidas en agua del mismo río en donde crecen. Al momento de realizar la polinización se escogieron las flores que tuvieran la mayor cantidad de polen expuesto; este polen fue tomado de las flores donadoras con un pincel y fue distribuido uniformemente en el estigma de las flores receptoras. Las membranas de diálisis sólo fueron removidas durante el tiempo que abarcó la polinización. Una vez que el estigma de la flor receptora quedó impregnado de polen de la especie contraria, las flores fueron embolsadas nuevamente. Este procedimiento se llevó a cabo en 33 flores de *M. rubrum* (utilizando *M. schiedeanum* como donador de polen) y en 26 flores de *M. schiedeanum* (utilizando *M. rubrum* como donador de polen). Se establecieron distintos tiempos postaislamiento para realizar las polinizaciones cruzadas, abarcando así un rango más amplio en el desarrollo de la flor y elevando las posibilidades de que el estigma se encontrara en etapa receptiva al momento de exposición al polen. Asimismo se establecieron distintos tiempos postpolinización para llevar a cabo la recolección y fijación de las flores tratadas, aumentando la probabilidad de encontrar tubos polínicos en algún tejido del gineceo. Los tiempos de polinización y recolección se muestran en la tabla 2.

Especie receptora	<i>Marathrum rubrum</i>	<i>Marathrum schiedeanum</i>
Total de flores emasculadas y aisladas	33	26
Flores polinizadas 24 horas postaislamiento	26	18
Flores colectadas		
Tiempo 1: 24 horas postpolinización	6	10
Tiempo 2: 48 horas postpolinización	4	2
Tiempo 3: 72 horas postpolinización	2	2
Flores polinizadas 48 horas postaislamiento	4	6
Flores colectadas		
Tiempo 1: 24 horas postpolinización	2	
Tiempo 2: 48 horas postpolinización	2	5

Tabla 2. Resumen de las pruebas de polinización cruzada entre *M. rubrum* y *M. schiedeanum*. Las diferencias entre el número de flores que iniciaron el tratamiento y el total de flores colectadas se deben a las pérdidas sufridas durante el transcurso del experimento.

Controles

Como apoyo a las pruebas de receptividad en estigma se realizaron colectas de estigmas y ovarios en las primeras cuatro etapas de desarrollo de la flor de ambas especies. Se colectaron 10 flores por etapa para cada especie. Estas flores no fueron sometidas a ningún tratamiento con el fin de correlacionar la presencia de tubos polínicos en estigmas y ovario con la receptividad estigmática.

Todas las flores colectadas fueron fijadas en FAA (formaldehído, etanol 96%, ácido acético glacial, agua en proporción 5:50:10:35) (López-Curto *et al.*, 2005) para ser trasladadas al laboratorio.

TRABAJO DE LABORATORIO

Las muestras transportadas en FAA hasta el laboratorio fueron posteriormente teñidas con azul de anilina, adaptando el conjunto procedimientos descritos por Kearns e Inouye (1993) para este fin.

Las muestras pasaron del fijador a una solución de NaOH 1N por un tiempo de dos horas, con el fin de reblandecer el tejido. Una vez transcurrido este lapso las muestras se mantuvieron durante una noche en una solución de azul de anilina al 1% en K_3PO_4 0.1N. El K_3PO_4 se utiliza como decolorante del azul de anilina; de no realizarse esto la solución teñiría el tejido inespecíficamente e interferiría con la fluorescencia. Las muestras ya teñidas fueron seccionadas, separando la región estigmática (*Marathrum* presenta dos estigmas de naturaleza sésil donde no se aprecia el estilo) del resto del ovario. Con las secciones de cada una de las muestras se prepararon laminillas temporales mediante el aplastado (*squash*) del tejido tratado. Los aplastados de estigmas y ovarios fueron posteriormente observados al microscopio de fluorescencia.

Todas las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus Provis AX70, Tokio. La fluorescencia fue inducida mediante luz ultravioleta (330-385 nm).

RESULTADOS

Receptividad estigmática

Los estigmas de *M. rubrum* y *M. schiedeanum* se encuentran receptivos hasta que la flor se encuentra en la etapa 4, cuando los estigmas se encuentran separados. De las 60 flores analizadas para las primeras tres etapas de desarrollo (20 flores por etapa) sólo dos flores en etapa 3 (correspondientes a 3.34 % del total) mostraron reacción positiva al peróxido de hidrógeno en el caso de *M. rubrum*; en el caso de *M. schiedeanum* ninguna de las 60 flores analizadas en estas tres etapas mostró reacción positiva. De las 20 flores analizadas en etapa 4 para *M. rubrum*, 17 (85%) dieron reacción positiva al peróxido de hidrógeno, mientras que para *M. schiedeanum* 14 flores (70%) mostraron esta misma reacción. De las 20 flores analizadas en etapa 5 para cada especie, tres (15%) mostraron una reacción positiva en *M. rubrum* y cuatro (20%) en *M. schiedeanum*. Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 3.

Etapa	<i>Marathrum rubrum</i>	<i>Marathrum schiedeanum</i>
1	0	0
2	0	0
3	10	0
4	85	70
5	15	20

Tabla 3. Porcentajes (%) de reacción positiva al H_2O_2 de estigmas en distintas etapas de desarrollo. Se analizaron 20 flores por especie para cada etapa.

Las flores seleccionadas para ser emasculadas y aisladas fueron flores en etapa 3, en la cual el estigma aún no se encuentra receptivo. El tiempo transcurrido desde el aislamiento de las flores hasta la polinización fue suficiente para que las flores tratadas pasaran de etapa 3 a etapa 4 (aproximadamente 24 horas), en la que los estigmas se encuentran abiertos y receptivos.

Cruzas intraespecíficas

Se observaron 10 flores autopolinizadas de cada especie. En el caso de *M. rubrum*, 80% si presentaron tubos polínicos. En *M. schiedeanum*, se observaron tubos

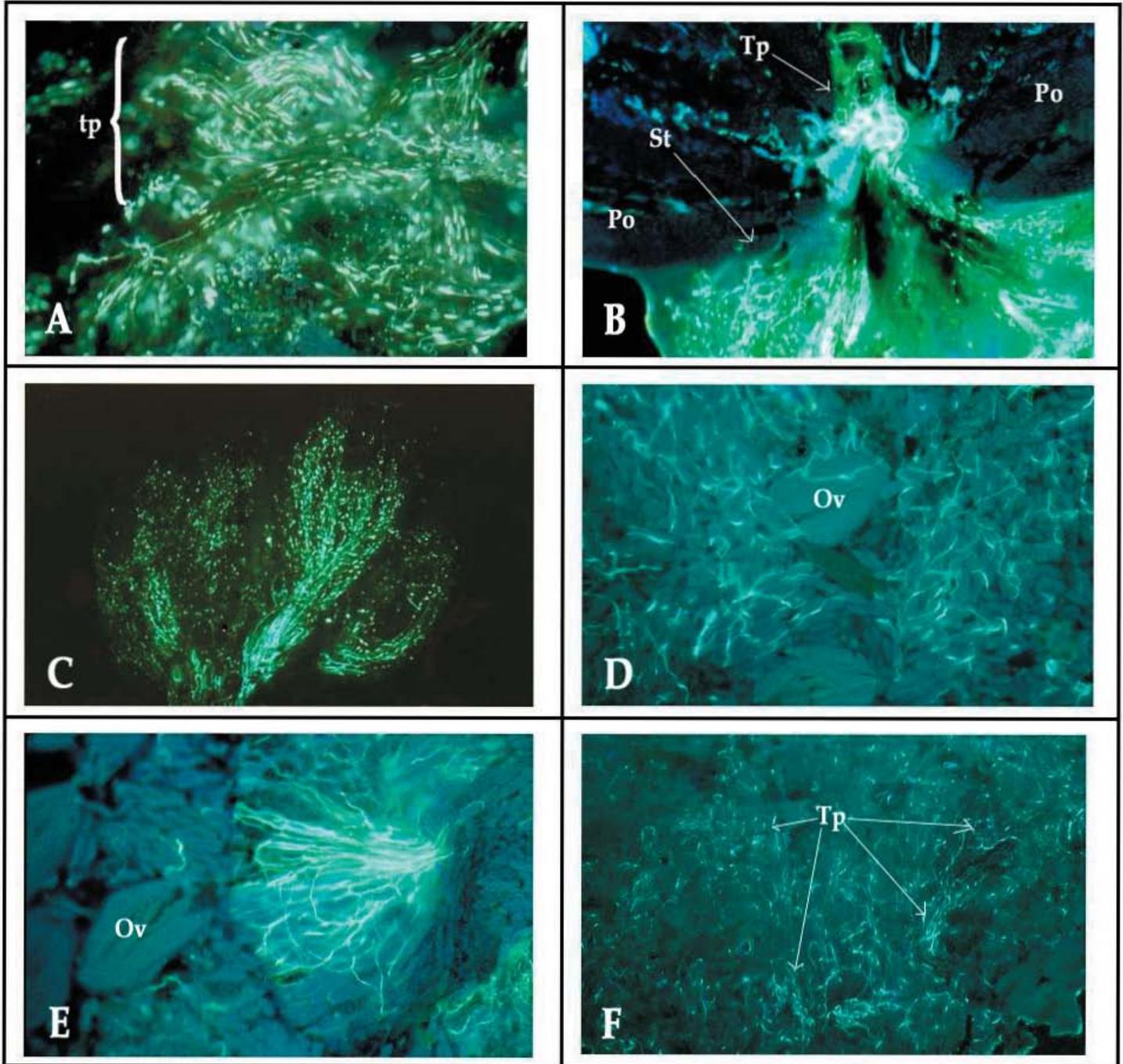
polínicos en el 60% de las muestras. No fue posible observar la presencia de granos de polen en los estigmas de las muestras que no presentaron tubos polínicos. Los tubos polínicos en las muestras observadas se encontraban distribuidos tanto en el tejido de la placenta como en el estigma.

Cruzas interespecíficas

Se observaron 16 flores distintas de *M. rubrum* y 19 de *M. schiedeanaum*. La presencia de tubos polínicos en los estigmas y placenta de las flores tratadas fue claramente establecida en ambas especies (figura 7). No existieron diferencias notables en la distribución o abundancia de tubos polínicos con respecto a los distintos tiempos de polinización y recolección (los tubos polínicos se distribuyen ampliamente en la placenta y estigmas de las flores observadas). Al igual que en las cruza intraespecíficas, no se observó la presencia de granos de polen en el estigma de las muestras en las que no se observaron tubos polínicos. La ausencia de tubos polínicos se presentó en cinco flores de *M. rubrum* (31.25% del total de flores observadas) y en siete de *M. schiedeanaum* (36.84% del total de flores observadas).

En una cruza *M. schiedeanaum* x *M. rubrum*, fue posible observar un tubo polínico en contacto con el micrópilo de un óvulo (datos no mostrados).

Figura 7. (A) Parte del estigma de una flor de *M. rubrum* polinizada con polen de *M. schiedeanaum*; se aprecia una gran cantidad de tubos polínicos (tp) fluoresciendo en todo el tejido estigmático (25x). (B) Parte del estigma (st) de una flor de *M. schiedeanaum* polinizada con polen de *M. rubrum*; los rastros de calosa correspondientes a tubos polínicos (tp) se aprecian en verde; el tejido estigmático se observa en la parte inferior de la fotografía (St); las células rectangulares en la parte superior corresponden a la pared del ovario (Po) y las células teñidas de azul en el borde superior son parte del tejido de la placenta (12.4x). (C) Estigmas de una flor de *M. rubrum* polinizada con polen de *M. schiedeanaum*; se pueden observar tubos polínicos en color verde en todo el tejido estigmático (10x). (D) Tejido de la placenta de una flor de *M. schiedeanaum* polinizada con polen de *M. rubrum*; se observan rastros de tubos polínicos en todo el tejido; en la parte central de la fotografía se aprecia un óvulo (Ov) (25x). (E) Tejido de la placenta de una flor de *M. schiedeanaum* polinizada con *M. rubrum*; se aprecia una gran cantidad de tubos polínicos y también se distingue un óvulo (Ov; 27x). (F) Tejido de la placenta de una flor de *M. rubrum* polinizada con polen de *M. schiedeanaum*, se aprecia una gran cantidad de tubos polínicos (tp; 10x).



Controles

Se observaron estigmas y ovarios de flores en etapas 1, 2 y 3 de flores recolectadas que no fueron sometidas a ningún tratamiento (no se removieron anteras, no fueron aisladas, ni se sometieron a polinización cruzada). Lo anterior se realizó en 10 flores de cada etapa mencionada y en ningún caso se detectó la presencia de tubos polínicos.

Se observaron estigmas y ovarios de 10 flores en la etapa 4 (etapa en la que fueron recolectadas las flores de los tratamientos propuestos) que no fueron sometidas a ningún tratamiento. Se observaron tubos polínicos en el 70% de las flores observadas, los cuales presentaron una distribución y abundancia semejante a las flores tratadas.

DISCUSIÓN

La presencia de tubos polínicos en flores sometidas a tratamientos de polinización cruzada en este estudio, es resultado únicamente de dicho tratamiento y no de polinización natural, ya que el método de aislamiento usando bolsas de diálisis (propuesto originalmente por Philbrick y Novelo, 1998, para estudios en *Marathrum*) resultó efectivo para prevenir la entrada natural de polen. Además el momento en el que estas flores fueron aisladas es previo al inicio de la receptividad de los estigmas.

Los estigmas no receptivos corresponden al inicio de la etapa tres, en la cual dichos estigmas permanecen juntos (Guzmán-Merodio *et al.*, 2005). La no receptividad queda establecida por la ausencia de tubos polínicos en el estigma de flores en la etapa tres y etapas previas a ésta, al ser observadas al microscopio de epifluorescencia con la técnica de azul de anilina, así como mediante las pruebas con peróxido de hidrógeno en estigmas intactos de flores creciendo en su hábitat natural. Aunque los resultados de las pruebas en fresco son ligeramente diferentes entre ambas especies, los resultados demuestran que no hay receptividad sino hasta un punto avanzado de la etapa tres o en una etapa cuatro muy temprana. La etapa tres propuesta por Guzmán-Merodio, 2005, podría dividirse en dos etapas basándose únicamente en el inicio de la receptividad. Los resultados sobre el inicio de la receptividad estigmática en este estudio se contraponen con los resultados obtenidos por Philbrick y Novelo, 1998, quienes proponen que los estigmas de *M. rubrum* se encuentran receptivos al momento de salir de la espátula, durante la etapa dos (Guzmán-Merodio, 2005).

La presencia de tubos polínicos en flores embolsadas y no emasculadas de ambas especies, observados al microscopio de epifluorescencia con la técnica de azul de anilina, demuestra que no existen sistemas de autoincompatibilidad, ya que ambas especies aceptan su propio polen. El polen de ambas especies es capaz de germinar en su propio estigma y los tubos polínicos pueden crecer sin problemas a través este tejido, así como a través de la placenta, incluso estableciendo contacto con los óvulos. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, no es posible afirmar que exista autogamia en ninguna de las especies, ya que no se llevó a las flores autopolinizadas hasta una etapa de producción de semillas, sin embargo, estudios realizados por Philbrick y Novelo, 1998, demostraron la ocurrencia de autoincompatibilidad en *M. rubrum* (embolsando flores cuyos estigmas aún no se encontraban receptivos para la obtención y conteo de semillas y observando el crecimiento de tubos polínicos en estigmas y ovarios de flores autopolinizadas).

La ocurrencia de autogamia en poblaciones naturales de ambas especies es sumamente probable, pues aunado a la ausencia de sistemas de autoincompatibilidad, no existen barreras físicas (hercogamia) ni temporales

(dicogamia) que impidan la autofecundación.

Establecer la presencia de autogamia y la proporción en la que ésta ocurre en ambas especies es de suma importancia para abundar en el conocimiento de su dinámica reproductiva, ya que *Marathrum*, así como las podostemáceas en general, muestra una alta proporción de reproducción sexual, contrario a lo esperado en las plantas acuáticas (Sculthorpe, 1967).

La presencia de tubos polínicos en estigmas y ovarios de las cruas efectuadas entre *M. rubrum* y *M. schiedeanum* y viceversa demuestra la ausencia de un sistema de incompatibilidad interespecífica que actúe previamente a la entrada del gametofito masculino al saco embrionario (gametofito femenino).

La ausencia de un sistema de reconocimiento activo derivado de la interacción de alelos S entre el polen y el gineceo es predecible, ya que ninguna de las especies presenta un sistema de autoincompatibilidad. Sin embargo, hay que destacar que tampoco existen barreras reproductivas no activas derivadas de la incongruencia.

Se entiende por una barrera reproductiva no activa todas aquellas que no se encuentran reguladas genéticamente y, por incongruencia, el conjunto de barreras que impiden el éxito reproductivo entre dos taxa distintos.

Por último, en este trabajo no fue posible establecer si *M. rubrum* y *M. schiedeanum* son interfértiles, pues no se determinó si existen barreras reproductivas, de cualquier naturaleza, que actúen después de la entrada del tubo polínico al saco embrionario o posteriores que impidan el desarrollo normal del embrión y la consecuente formación de la semilla, o que interfieran con la capacidad reproductiva de los híbridos. Existen muchos mecanismos de incompatibilidad que pueden presentarse después de la entrada del tubo polínico al óvulo como la inhibición por parte del ovario, inhibición pre fecundación en el óvulo, rechazo postcigótico, inhibición ovular o una baja adecuación de los híbridos (Liedl y Anderson, 1993). Sin embargo, una fecundación exitosa es probable en este caso, ya que generalmente la incompatibilidad entre miembros de taxa cercanos (como es el caso en este estudio) se encuentra determinada por sistemas de reconocimiento activos (Raghavan, 1997), mismos que se encuentran ausentes en esta entrecruza. Esto será sujeto de otra investigación.

Si *M. rubrum* es realmente un ecotipo de *M. schiedeanum*, podríamos esperar que plantas de ambas poblaciones fueran capaces de intercambiar genes libremente, sin pérdida de fertilidad o vigor de la progenie.

CONCLUSIONES

- En ambas especies, la receptividad estigmática comienza en un punto posterior al inicio de la Etapa 3 (Guzmán-Merodio, *et al.*, 2005). Previo a este momento no hay germinación de los granos de polen en los estigmas.
- No existen barreras de autoincompatibilidad que constituyan barreras previas a la fecundación tanto en *Marathrum rubrum* como en *Marathrum schiedeanum*.
- No existen barreras de incompatibilidad interespecíficas (previas a la entrada del gametofito masculino al saco embrionario) entre *Marathrum rubrum* y *Marathrum schiedeanum*.

REFERENCIAS

- Arekal, G. D., y C. R. Nagendran. 1975. Embryo sac of *Hydrobryopsis sessilis* (Podostemaceae). Origin, organization and significance. *Bot. Notiser.* **128**: 332-337.
- Ascher, P. D. 1976. Self-incompatibility systems in floricultura crops. *Acta Hortic.* **63**: 205-215.
- Battaglia, E. 1987. Embryological questions: 11. Has the debated case of Podostemaceae been resolved? *Annali di botanica.* **45**: 37-64.
- Bedinger, P. A., K. J. Hardeman y C. A. Loukides. 1994. Travelling in style: the cell biology of pollen. *Trends in Cell Biology.* **4**: 132-138.
- Cook, C.D.K. 1990. Aquatic Plant Book. SPB, The Hague, 228 pp.
- Cruz, G. F., B. A. McClure, G. Busot, G. García, J. A. Juárez, L. T. Sánchez. 2001. Sistemas genéticos de reconocimiento del polen en angiospermas. En: Bernal-Lugo, I. y H. Loza-Tavera (eds.). *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.* Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 135-146.
- Engler, A. 1930. Reihe Podostemales. En: Engler, A. y K. Prantl (eds.) *Die natürlichen pflanzenfamilien.* 2nd Ed. Vol **18a**. Leipzi: Englemann, 1-68.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climático de Köppen. Offset Larios. 4^a Ed. México D.F. 217 pp.
- Grant, V. 1989. Especiación Vegetal. Editorial Limusa, México D.F. 590 pp.
- Grubert, M. 1974. Podostemaceen-Studien. Teil 1. Zur Ökologie einider venezolanischer Podostemaceen. *Beitr. Biol. Pflanzen.* **50**: 321-391.
- Guzmán-Merodio, D., R. Luna-Ramos, M. Collazo-Ortega, A. Novelo-Retana, J. Márquez-Guzmán. 2005. Studies in Mexican Podostemaceae: Morphological and embryological correlation in *Marathrum rubrum*. XVII International Botanical Congress. Vienna, Austria. P1212.
- Horne, A. J. y C. R. Goldman. 1994. Limnology. 2a Ed. McGraw-Hill, Nueva York, 576 pp.
- Hutchens, J. J., J. B. Wallace y E. D. Romaniszyn. 2003. The role of *Podostemum ceratophyllum* Michx. in structuring benthic macroinvertebrate assemblages in a southern Appalachian river. North American Benthological Society Annual Meeting. Athens, Georgia.
- Jäger-Zürn, I. 1997. Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichoideae). *Aquat. Bot.* **57**: 151-182.
- Jäger-Zürn, I. y M. Grubert. 2000. Podostemaceae depend on sticky biofilms with respect to attachment to rocks in waterfalls. *Int. J. Plant Sci.* **161**: 599-607.
- Kapil, R. N. 1970. Podostemaceae. *Bulletin of the Indian National Science Academy.* **41**: 104-109.

- Kearns, C. A. y D. W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado. 583 pp.
- Kita, Y., y M. Kato. 2001. Intrafamilial phylogeny of the aquatic angiosperm Podostemaceae inferred from the nucleotide sequence of the *matk* gene. *Plant Biol.* **3**: 156-163.
- Kholsa, Ch., K. R. Shivanna y H. Y. Mohan Ram. 2000. Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* **67** (2): 143-154.
- Khosla, Ch., K. R. Shivanna y H. Y. Mohan Ram. 2001. Cleistogamy in *Griffithella hookeriana* (Podostemaceae). *S.African J. Bot.* **67**: 320-324.
- Koeppen, W. 1948. Climatología. Fondo de Cultura Económica. México D.F. 478 pp.
- Les, D. H., C. T. Philbrick y A. Novelo. 1997. The phylogenetic position of river-weeds (Podostemaceae): Insights from *rbcL* sequence data. *Aquat. Bot.* **57**: 5-27.
- Liedl, B. E., y N. O. Anderson. 1993. Reproductive barriers: identification, uses, and circumvention. En: J. Janick. (ed.) *Plant Breeding Reviews*. Vol **11**. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. 11-154.
- López-Curto, L., J. Márquez-Guzmán, G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de Laboratorio. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 179 pp.
- Luther, H. 1949. Vorschlag zu einer ökologischen Grundeinteilung der Hydrophyten. *Acta Bot. Fenn.* **44**, 1-15.
- Marcinek, P. A., M. C. Freeman y B. J. Freeman. 2003. Distribution and abundance of three endemic fishes in the shoals of the Upper Flint River System. Georgia Water Resources Conference. 2003.
- Mohan Ram, H. Y. y A. Sehgal. 1992. Podostemaceae, the strange family of aquatic angiosperms. *The Pallaeobotanist.* **41**: 192-197.
- Murguía-Sánchez, G., A. Novelo R., C. T. Philbrick y J. Márquez-Guzmán. 2001. Desarrollo de los verticilos sexuales de *Vanroyenella plumosa* Novelo & Philbrick (Podostemaceae). *Acta Botánica Mexicana.* **57**: 37-50.
- Murguía-Sánchez, G., A. Novelo R., C. T. Philbrick y J. Márquez-Guzmán. 2002. Embryo sac development in *Vanroyenella plumosa* Podostemaceae (Podostemoideae). *Aquat. Bot.* **73**: 201-210.
- Murguía-Sánchez, G. 2003. Embriología comparada de los géneros de la familia Podostemaceae en México. Tesis de doctorado (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 125 pp.
- Novelo R. y C. T. Philbrick. 1993. A new species of *Marathrum* (Podostemaceae) from Jalisco, México. *Novon.* **3**: 456-458.
- Novelo R. y C. T. Philbrick. 1997. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. *Aquat. Bot.* **57**: 275-303.

- Oropeza, N., P. Mercado-Ruaro, A. Novelo R., y C. T., Philbrick, 1998. Karyomorphological studies of Mexican species of *Marathrum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* **62**: 207–211.
- Pagezy, H. y M. Jégu. 2002. Valeur patrimoniale de Serrasalminae herbivores du Haut Maroni (Guyane française): approches biologique et socioculturelle en pays Wayana, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **364** : 49 – 69.
- Philbrick, C. T., y A. Novelo. 1993. River weeds: a fascinating family of aquatic flowering plants. *Aquaphyte* **13**: 6-7.
- Philbrick C. T., y A. Novelo. 1994. Seed germination of Mexican Podostemaceae. *Aquat. Bot.* **48**: 145-151.
- Philbrick, C. T., y A. Novelo. 1995. New World Podostemaceae: ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia*. **47**: 210-222.
- Philbrick, C. T., y A. Novelo. 1997. Ovule number, seed number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquat. Bot.* **57**: 183-200.
- Philbrick, C. T., y A. Novelo. 1998. Flowering phenology, pollen flow and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* **62**: 199-206.
- Philbrick, C. T., y A. Novelo. 2001. A new species of *Podostemum* (Podostemaceae) from the states of Paraná and Santa Catarina, Brazil. *Novon* **11**: 92-96.
- Philbrick, C. T., y A. Novelo. 2004. Monograph of *Podostemum* (Podostemaceae). Systematic Botany Monographs. Vol. 70. 106 pp.
- Quiroz, F. A., A. Novelo y C. T. Philbrick. 1997. Water chemistry and the distribution of Mexican Podostemaceae: a preliminary evaluation. *Aquat. Bot.* **57**: 201-212.
- Raghavan, V. 1997. Molecular Embryology of Flowering Plants. Cambridge University Press. 690 pp.
- Raghavan, V. 2003. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytologist*. **159**: 565-583
- Rutishauser, R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river weeds). *Aquat. Bot.* **57**: 29-70.
- Rzedowski, J. 1988. Vegetación de México. Editorial Limusa. 4^a reimpresión. México D.F. 432 pp.
- Sculthorpe, C.D. 1967. The Biology of Aquatic Vascular Plants. St. Martin's Press, Nueva York. 610 pp.
- Soltis, D. E., M. E. Mort, P. S. Soltis, C. Hibsich-Jetter, E. A. Zimmer y D. Morgan. 1999. Phylogenetic relationships of the enigmatic angiosperm family Podostemaceae inferred from 18S rDNA and *rbcL* sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **11**(2): 261-272.
- Spichiger, R. E., V. Savolainen, M. Fiegat y D. Jeanmonod. 2004. Systematic

Botany of Flowering Plants. A new phylogenetic approach to Angiosperms of the temperate and tropical regions. Science Publishers, Inc. New Hampshire. 414 pp.

- Torres-Navarro, C. I. y J. Lyons. 1999. Diet of *Agonostomus monticola* (Pisces: Mugilidae) in the Río Ayuquila, Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, México. Tropiweb. Organización para Estudios Tropicales, San José, Costa Rica.

- Ueda, K., T. Hanyuda, A. Nakano, T. Shluchi, A. Seo, H. Okubo y M. Hotta. 1997. Molecular phylogenetic position of Podostemaceae, a marvelous aquatic flowering plant family. *J. Plant. Res.* **110**: 274-281.

- van Royen, P. 1951. The Podostemaceae of the New World. Part 1. *Meded. Bot. Mus. Herb. Utrecht.* **107**: 1-151.

- van Royen, P. 1953. The Podostemaceae of the New World. Part 2. *Acta Bot. Neerl.* **2**: 1-21.

- van Royen, P. 1954. The Podostemaceae of the New World. Part 3. *Acta Bot. Neerl.* **3**: 215-263.

- Willis, J. C. 1902. Studies in the morphology and ecology of the Podostemaceae of Ceylon and India. *Ann. Roy. Bot. Gardens, Peradeniya.* **1**: 267-465.

- Zeisler, M. 1938. Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. *Beiheft Botanisches Zentralblatt.* **58**: 308-318.