



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Germinación y desarrollo temprano de plántulas
de *Oserya coulteriana* (Podostemaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

GUILLERMO RAÚL CASTILLO SÁNCHEZ



TUTORA
DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Castillo

Sánchez

Guillermo Raúl

56 22 49 09

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

097201201

2. Datos del tutor

Dra

Margarita

Collazo

Ortega

3. Datos del sinodal 1

Dra

Judith Guadalupe

Márquez

Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Dra

Ana María Lourdes

González

Zertuche

5. Datos del sinodal 3

M en C

Karina

Jiménez

Durán

6. Datos del sinodal 4

M en C

María Ivonne

Reyes

Ortega

7. Datos del trabajo escrito

Germinación y desarrollo temprano en
plántulas de *Oseya coulteriana*

52 p

2007

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Margarita Collazo por dirigir ésta tesis. Por todo lo que me has enseñado, por todo tu apoyo y sobre todo por tu amistad. Mil gracias.

Al Dr. Alejandro Novelo Retana† por darme la oportunidad de trabajar con éste grupo tan interesante de plantas.

A la M. en C. Karina Jiménez Durán, a la Dra. Ana María Lourdes González Zertuche, a la Dra. Ivonne Reyes Ortega, y a la Dra. Judith Márquez Guzmán por revisar mi tesis y aceptar ser mis sinodales.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas por permitirme hacer la Tesis.

Al Laboratorio de Ecofisiología Tropical del Instituto de Ecología, UNAM.

Al Laboratorio de genética ecológica y evolución del Instituto de ecología, UNAM.

A la Unidad de Ambientes Controlados de la facultad de Ciencias, UNAM, en especial a la Biól. Patricia Olgún Santos.

A la M. en C. María Eugenia Muñiz Díaz de León por su ayuda y por facilitar el uso de las cámaras de germinación.

A la Dra. Silvia Espinosa por su apoyo en el microscopio electrónico de barrido.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla y a la Dra. Sonia Vázquez por sus correcciones.

A Berenice, por tu ácida ternura.

A Ileana, por el rock, siempre seré tu fan # 1.

A Mariana,.....por ser como sólo ella es.

A Raúl, Alejandro y Samael. Ahí la llevamos.

A mis amigos: Soledad, Roberto, Dani Tokman, Fernanda, Diego, Eugenio, Pilar, Lilibeth, Laila, Ale Hapiness, Daniel Quiñones, Gabriela, May, Ángela, Sil, Rossella, Armando, Rafa, Jorge, Jane, Enrique, Chacho, Laura, Raúl, Arturo, Abraham, Xoch, Eve, Andrea, Miguel, Stella, Javier, Beatriz, Wilkins, Leopoldo, Jesús, Isabel, Ana, Garbage, Benjamín, Daniel, Daniela, Marce, Miriam, Mau, Romi, Varenka. A todos los que se me olvidaron....ups.

A mis profesores y compañeros del taller de cactáceas. A Raúl Luna por la ayuda en campo y su parsimonia. A los que me han acompañado a lo largo de estos años, a todos ustedes, GRACIAS!

El presente trabajo fue realizado en el taller: "Biología del desarrollo y función de las estructuras reproductoras en cactáceas"

-It is by no means an irrational fancy that, in a future existence, we shall look upon what we think our present existence, as a dream.-

Edgar Allan Poe.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
La semilla	3
Importancia de la germinación	4
La germinación como proceso	5
Patrones y Factores que regulan la germinación	6
Agua	6
Luz	8
Temperatura	9
Edad de la semilla	10
Quiescencia	11
Latencia	11
Germinación y desarrollo temprano en plantas acuáticas	13
Generalidades de la familia Podostemaceae	15
Ciclo de vida	18
Sistemática y filogenia	19
Podostemáceas en México	20
Estudios de germinación y desarrollo temprano en podostemáceas	21
Justificación	23
Objetivos	23
Hipótesis	24
Descripción del género	24
Descripción de la especie	25
Distribución de la especie	27
Método	27
Sitio de estudio	27
Colecta de frutos	29
Germinación	29
Efecto del tiempo de almacenamiento	31
Desarrollo morfológico	32
Análisis de los resultados	32
Resultados	33
Germinación	33
Efecto del tiempo de almacenamiento	36
Patrón de germinación y desarrollo de plántulas	36
Discusión	40
Conclusiones	45
Bibliografía	46
Anexos	51

Germinación y desarrollo temprano en plántulas de *Oserya coulteriana*
(Podostemaceae)

RESUMEN

La familia Podostemaceae es la más grande de plantas estrictamente acuáticas, crecen firmemente adheridas a rocas en ríos de corrientes fuertes. Las dinámicas evolutivas han hecho que esta familia haya desarrollado adaptaciones que le permitan vivir bajo el estrés mecánico de los ambientes que habitan. A diferencia de otras plantas acuáticas, en Podostemaceae la vía sexual es el modo de reproducción más importante en comparación con la reproducción asexual. La germinación y el establecimiento de las plántulas son procesos de suma importancia en la historia de vida de estas plantas, ya que determinan su distribución, supervivencia y abundancia. Existen pocos trabajos que estudien la germinación de las semillas, el desarrollo temprano de las plántulas y el establecimiento de las plantas en las especies de esta familia. En este trabajo se estudió la influencia de la temperatura, la edad de las semillas y la calidad de luz sobre la germinación de *Oserya coulteriana*. Para ello se realizaron en laboratorio experimentos de germinación con lotes de semillas de 3 edades de almacenamiento: 3 meses, 8 meses (procedentes de una misma cohorte) y de 9 años. Las semillas se sometieron a tratamientos de temperatura constante (25° C) y alternante (15-25° C) y a tratamientos de calidad de luz (luz blanca, roja, roja lejana y oscuridad). Adicionalmente se siguió mediante microscopía óptica y electrónica de barrido el desarrollo temprano de plántulas hasta los 30 días de edad después de la siembra. Se encontró que las semillas se comportaron como fotoblásticas positivas, termoblásticas y recalcitrantes. La velocidad de germinación en temperatura constante fue mayor que a temperatura alternante, independientemente de la edad de las semillas; la germinación a temperatura alternante fue intermitente, mientras que a temperatura constante fue periódica. Las semillas almacenadas durante 8 meses fueron viables, no así las de 9 años de almacenamiento. Las plántulas presentaron el patrón de desarrollo morfológico característico de la subfamilia Podostemoideae hasta los 30 días de edad.

INTRODUCCIÓN

La familia Podostemaceae se distribuye en ríos de corriente rápida en regiones tropicales del mundo (Philbrick y Novelo, 1994). A diferencia de lo que sucede en la mayoría de las plantas acuáticas, en esta familia la reproducción sexual es sumamente importante, ya que su ciclo de vida está estrechamente relacionado con el nivel de agua de los ríos en donde se desarrollan, dependiendo de sus semillas para poder establecer nuevamente sus poblaciones (Philbrick y Novelo, 1994).

La semilla, además de ser un modo de conservación y propagación de la especie, es la unidad portadora de variación genética al ser el resultado de la reproducción sexual (Esau, 1982; Besnier, 1989). La germinación es un proceso de suma importancia en el ciclo de vida, no sólo de las plantas acuáticas, sino de todas las plantas en general, dado que en este proceso se define qué individuos pasarán a ser plántulas que posteriormente se establecerán como adultos. Es por esto que es necesario estudiar la semilla y el proceso de germinación, fase de suma importancia en el ciclo de vida, para, de acuerdo con Vázquez-Yanes *et al.* (1997), ayudar a entender el modo en el que las poblaciones se establecen, ya que existen mecanismos y comportamientos germinativos que presentan las semillas ante las diferentes condiciones ambientales a las que pueden estar expuestas, maximizando de ese modo la sobrevivencia de las plántulas, y el establecimiento de los individuos que conformarán las poblaciones.

Los requerimientos para que la germinación se dispare son específicos para las semillas de cada especie. El tipo de luz, la temperatura y la edad de las semillas son factores muy importantes en la germinación, afectando la forma en la que se da este proceso, afectando la germinación, la cantidad de semillas que germinan o la velocidad a la cual lo hacen (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Existen escasos reportes sobre cómo influyen estos factores en la germinación de las semillas de las podostemáceas. En este trabajo se analizó cómo afecta la calidad de luz, la temperatura y la edad de la semilla al proceso de

germinación de *Oserya coulteriana*. Para ello se colectaron semillas en diferentes años, 1997, 2005, y 2006 (las dos últimas son dos colectas de una cohorte) en el río Horcones, en Puerto Vallarta, Jalisco, México, y se sometieron en laboratorio a tratamientos de calidad de luz (Blanca, Roja, Roja lejana y Oscuridad), y temperaturas constante (15° C) y alternante (15°-25° C). Adicionalmente se observó la morfología del desarrollo de las plántulas a partir de su germinación, y hasta aproximadamente los 30 días de edad, para obtener información de este proceso durante las primeras etapas del desarrollo de esta especie acuática.

El presente estudio pretende contribuir al conocimiento acerca del proceso de germinación de plantas acuáticas, de la familia Podostemaceae y en particular de *O. coulteriana*, especie endémica de México que, de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2003) se encuentra sujeta a protección especial.

ANTECEDENTES

La semilla

La semilla es una unidad de diseminación capaz de resistir las condiciones ambientales externas. Al ser la progenie de los organismos es una forma de propagación, continuidad y supervivencia de una especie; es la unidad portadora de la variabilidad genética debido a que es el producto de la reproducción sexual de las angiospermas (Esau, 1982; Besnier, 1989).

Cuatro estructuras constituyen a la semilla típica de las angiospermas eudicotiledóneas:

- El embrión: Es el producto de la fecundación de la ovocélula por un núcleo espermático (Bewley y Black, 1994). Consiste de un par de hojas cotiledonarias, plúmula (parte superior del eje embrionario), hipocótilo (región que se sitúa por debajo del nudo cotiledonario) y radícula (raíz embrionaria), que en algunos casos puede constar tan sólo de un grupo de células meristemáticas (Cronquist, 1997).
- El endospermo: Se trata de un tejido de nutrición que se forma como resultado de la triple fusión entre los núcleos de la célula central y un núcleo espermático. Las semillas se pueden clasificar de acuerdo a la presencia o ausencia de endospermo en endosperómicas y no endosperómicas. En algunas ocasiones aunque exista endospermo en la semilla, éste es sólo vestigial, en estos casos los cotiledones y/o perispermo adoptan la función de tejido de reserva (Bewley y Black, 1994).
- El perispermo: Es un tejido que surge durante el desarrollo de la nucela y que puede reducirse o ser absorbida al poco tiempo de iniciar su desarrollo. En algunas especies constituye la principal fuente de sustancias nutritivas (Besnier, 1989).
- Cubierta seminal: Se compone de dos estructuras, el tegmen y la testa, que derivan del tegumento interno y externo respectivamente (Besnier, 1989)

La cubierta seminal y los diversos tejidos de la semilla son muy importantes en el proceso de germinación porque funcionan como una fuente considerable de hormonas, nutrientes y sustancias inhibitoras de la germinación, además de que pueden ser barreras físicas para dicho proceso (Ramírez, 2003).

Importancia de la germinación

La germinación es un evento crucial en la historia de vida de las plantas pues de ella depende el establecimiento de los individuos (Bewley y Black, 1994). Los diferentes mecanismos y comportamientos de germinación que presentan las semillas ante la gran variedad de condiciones ambientales a las que están expuestas pudieron haber evolucionado en respuesta a los riesgos de la mortalidad de las plántulas, de modo que la posibilidad de supervivencia de la plántula resultante se maximiza en un ambiente hasta cierto punto heterogéneo. De tal manera que la germinación de cada especie responde a una combinación de factores que le brindan a la plántula una mayor oportunidad de establecimiento y supervivencia (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

La germinación como proceso.

La germinación es un proceso en donde el metabolismo del embrión pasa de un estado de reposo a un estado de alta actividad que conlleva a una serie de eventos tales como cambios estructurales, celulares, subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular (Bewley y Black, 1994).

Bewley (1997) describe la germinación como un proceso que consta de tres etapas definidas por los procesos que se llevan a cabo en cada una (Fig. 1).

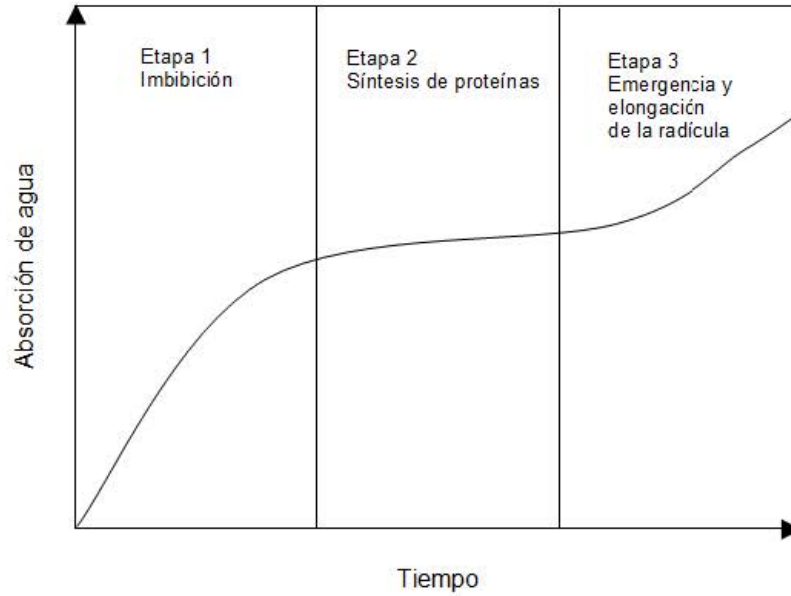


Figura 1. Etapas del proceso de germinación. Modificado de Bewley, 1997.

El proceso de germinación se inicia con la absorción de agua por parte de la semilla, evento conocido como imbibición; seguida de una segunda etapa de síntesis de proteínas, en la que existen altos niveles de actividad enzimática y síntesis macromolecular; finalmente en la etapa tres, mediante subsecuentes divisiones mitóticas y elongación celular se lleva a cabo la emergencia y elongación de la radícula (Bewley y Black, 1994).

Patrones y factores que regulan la germinación.

Se conoce como patrón de germinación al tiempo y a la velocidad a la cual ocurre la germinación de las semillas de una especie determinada. Son reconocidos cuatro patrones de comportamiento germinativo en cuanto a la distribución temporal de la germinación en una población (Salisbury y Ross, 1985):

1. Cuasi-simultánea: La germinación de las semillas de una población ocurre en un periodo de tiempo muy corto.
2. Germinación continua: La germinación de las semillas de una población se da de manera relativamente constante durante un periodo de tiempo largo. No ocurren picos germinativos.

3. Germinación intermitente: Durante la germinación de las semillas de una población ocurren picos germinativos de forma irregular.
4. Germinación periódica: Durante la germinación de las semillas de una población ocurren picos germinativos de forma regular durante la germinación.

Estos patrones de germinación están determinados por una serie de factores bióticos y abióticos (Schat, 1983):

Agua: Dado que la semilla se encuentra en un estado de alta deshidratación cuando se desprende de la planta madre, la disponibilidad de agua es fundamental para que se inicie la germinación. Este estado de deshidratación mantiene al metabolismo de la semilla en un nivel muy bajo, teniendo que absorber agua para reactivarlo y poder comenzar la germinación. Esta absorción de agua (imbibición) se da inicialmente a un ritmo acelerado, posteriormente, conforme la germinación continúa, la absorción de agua disminuye, comenzando entonces el crecimiento de la plántula (Bidwell, 1979).

El estrés hídrico tiene efectos sobre la velocidad de germinación y el porcentaje de germinación. Besnier (1989) señala que existen tres factores que pueden determinar la rapidez de la hidratación de las semillas:

a) Diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el sustrato: El potencial hídrico se define como el potencial químico del agua dividido entre el volumen parcial molal del agua (Taíz y Zeiger, 2006), y en términos prácticos se considera la capacidad de un sistema de ceder agua. En la semilla, dicha capacidad está determinada por el agua que se almacena en las membranas y proteínas, y en el sustrato por su capacidad de retención de agua. La diferencia de potencial de ambas partes determina la velocidad a la cual la semilla absorbe agua. Al inicio de la imbibición la diferencia de potencial entre la semilla y el sustrato es muy grande (siendo mayor en

éste), pero conforme la semilla se hidrata esta diferencia disminuye ya que la presión de turgencia de las células de la semilla aumenta y la disponibilidad del agua en el sustrato que se encuentra en contacto directo con la semilla se reduce. De este modo las semillas que se encuentren ubicadas en capas más profundas del suelo tendrán más disponibilidad de agua para germinar en comparación con semillas situadas cerca o sobre la superficie del suelo (Besnier, 1989), dependiendo también del tamaño de las semillas, sus reservas y respuesta a la luz.

b) Contacto entre la semilla y el suelo: La morfología de la semilla y las características del suelo determinan cómo será el contacto entre ambas partes. Generalmente las semillas pequeñas, con testa lisa y con presencia de mucílago presentan un mejor contacto en comparación con aquellas semillas que sean más grandes, con testa rugosa y sin mucílago. En semillas que germinan sobre el sustrato, la superficie de contacto es de particular importancia ya que ésta siempre será menor en ellas en comparación con semillas que están enterradas (Besnier, 1989).

c) Permeabilidad de la cubierta: Las semillas de muchas especies presentan cubiertas seminales que impiden la entrada de agua al interior de ésta, retrasando considerablemente la germinación, que está determinada por componentes de la cubierta seminal tales como la cutícula, esclereidas o suberina (Bewley y Black, 1994).

Luz: La luz ejerce un efecto en la germinación de las semillas de muchas especies. De acuerdo a la respuesta a la luz las semillas se han clasificado, de acuerdo a Bidwell (1979) en:

- Fotoblásticas positivas: En estas semillas la luz induce la germinación.
- Fotoblásticas negativas: En estas semillas la luz inhibe total o parcialmente la germinación.
- Indiferentes: Las semillas no exhiben cambios en la germinación cuando se exponen a la luz o a la oscuridad.

Las principales longitudes de onda del espectro lumínico que inciden sobre el proceso de germinación son la de 650-680 nm (luz roja), 710-740 nm (luz roja lejana) y de 400-500 nm (azul) (Taiz y Zeiger, 2006). Se conoce que la longitud de onda del espectro correspondiente al rojo promueve la germinación, en tanto que la del rojo lejano la inhibe (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Ambas longitudes de onda son absorbidas por una proteína-pigmento que funciona como sensor lumínico denominada fitocromo, que es un dímero con dos subunidades: la molécula que absorbe la luz (cromóforo, que en las plantas superiores es una fitocromobilina) y una cadena polipeptídica (apoproteína) (Taiz y Zeiger, 2006). El fitocromo posee dos formas fotoconvertibles: una inactiva (Pr) y otra activa (Pfr) que induce la respuesta e interviene en los procesos a través de cambios en la permeabilidad de la membrana, la actividad enzimática y la expresión genética (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

La conversión de Pr a Pfr se lleva a cabo bajo el efecto de la luz roja, mientras que la conversión de Pfr a Pr se lleva a cabo bajo el efecto de la luz roja lejana. En la oscuridad Pfr se transforma lentamente a Pr y de igual modo la disminución de temperatura en la noche provoca degradación térmica del Pfr. Estas dos formas de fitocromo corresponden a los picos de absorción de luz: a los 660 nm para Pr y a los 730 nm para Pfr (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

El espectro de absorción de Pr y Pfr se sobrelapan entre los 650 y 690 nm (Bidwell, 1979). El margen de absorción de ambas formas coincide alrededor de los 300 nm y hasta los 730 nm, de forma que a cierta longitud ambas formas la absorben, ocurriendo simultáneamente y en las dos direcciones ambas transformaciones fotoquímicas, estableciéndose entonces un fotoequilibrio que ha sido definido por la letra griega Ψ que indica la relación Pfr/P_{total} . La conversión de Pr a Pfr nunca se lleva a cabo en su totalidad, incluso en la longitud de onda en la que Pfr tiene su máxima absorbancia (730nm), esto se debe a que Pr puede absorber también un poco de esa longitud de onda, por lo que también ocurre al mismo tiempo la conversión de Pfr a Pr aunque en menor grado (Bewley y Black, 1994).

En la naturaleza las plantas están expuestas a un amplio espectro de luz, y es bajo esas condiciones de cambios en la luz del ambiente que el fitocromo debe trabajar para regular las respuestas de desarrollo (Taiz y Zeiger, 2006). La existencia del fitocromo permite a las semillas que requieren luz para germinar detectar diferencias en la calidad de luz existentes en la naturaleza. Por ejemplo, semillas fotoblásticas positivas que se encuentren debajo de un dosel sólo recibirán radiación roja lejana que no es captada por las hojas del dosel, provocando que éstas no germinen. En cuanto un claro se abre en el dosel y permite la entrada de luz roja, las semillas germinarán ya bajo las condiciones lumínicas adecuadas para el establecimiento y crecimiento de la plántula (Ramírez, 2003).

Temperatura

La temperatura influye significativamente sobre los procesos metabólicos de la germinación afectando la capacidad germinativa y la velocidad de germinación de las semillas (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Dado que la germinación es en gran parte un proceso bioquímico, la velocidad a la cual ocurre dependerá de la temperatura. De este modo, a diferentes temperaturas constantes se presentará una diferente velocidad de germinación. Existen tres temperaturas principales en las que puede ocurrir la germinación: óptima, máxima y mínima. La temperatura óptima es aquella a la cual el porcentaje y la velocidad de germinación alcanzan valores máximos. Por otro lado, la temperatura máxima es la temperatura más alta a la cual se presenta germinación, y la mínima es la más baja a la cual hay germinación (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

La alternancia de temperatura también tiene una gran influencia sobre la germinación debido a que promueve la activación de la maquinaria enzimática de la semilla y especialmente en la ruptura de la latencia, ya que en condiciones naturales la temperatura del suelo en sus capas superiores presenta variaciones a lo largo del día por lo que las semillas generalmente están sujetas a temperaturas alternantes (Besnier, 1989). Esto puede explicar porque se puede presentar la germinación cuando las semillas se someten a

combinaciones de temperatura, siendo mayor su efecto cuando la diferencia entre las temperaturas aumenta. Otro factor importante es la duración de las diferentes temperaturas que componen un fotoperiodo y el número de veces que se repite un ciclo (Bewley y Black, 1994).

Las semillas presentan diferentes mecanismos que les permiten detectar la alternancia de temperaturas tales como testas que modifican su permeabilidad o mecanismos químicos endógenos que activan el proceso de germinación cuando se presentan variaciones en la temperatura (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Edad de la semilla

Se conoce como longevidad ecológica a la capacidad de las semillas de permanecer vivas y viables por cierto periodo de tiempo en el suelo, mientras que se conoce como longevidad potencial a la capacidad de permanecer viables en condiciones de almacenamiento (Vázquez-Yanes, 1997).

Una forma de clasificación de las semillas usada actualmente se basa en la duración potencial de su viabilidad de acuerdo a la tolerancia a la desecación, dividiéndolas en semillas ortodoxas y recalcitrantes (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997):

Ortodoxas: Pueden desecarse a niveles muy bajos de humedad (menos del 10%) sin perder su viabilidad por periodos prolongados de tiempo.

Recalcitrantes: Presentan una longevidad menor en comparación con las ortodoxas. Mantienen un porcentaje de humedad más alto (mayor o igual al 15%), ya que de lo contrario pierden su viabilidad rápidamente.

Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado (com. personal), incluyen una tercera categoría, la de semillas intermedias, quienes tienen una mayor tolerancia a la deshidratación que las recalcitrantes pero menor que las ortodoxas y son intolerantes a las bajas temperaturas; su viabilidad es corta al igual que en las ortodoxas.

Quiescencia

Cuando una semilla, se encuentra en estado de reposo superficial debido tan solo a la ausencia de humedad, oxigenación, o condiciones adecuadas de luz y temperatura, se encuentra en estado de quiescencia, que desaparece en el momento en que los requerimientos básicos para la germinación son provistos. En cambio, si no germinan a pesar de esto, las semillas se encuentran en estado de latencia (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997),

Latencia

Se ha definido el término latencia como el periodo de interrupción del desarrollo debido al bloqueo químico, metabólico o estructural que impide la germinación aún cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas (Bewley y Black, 1994).

Según su origen se han descrito tres tipos básicos de latencia (Harper, 1977):

- Innata o primaria: La semilla se desprende de la planta madre en estado latente.
- Inducida o secundaria: La semilla adquiere esta latencia después de desprenderse de la planta madre debido a la presencia de factores ambientales desfavorables (ej: temperatura y luz) para su germinación. La semilla puede seguir sin germinar aún cuando el factor desfavorable haya desaparecido.

- Impuesta o forzada: Esta dada por factores ambientales como la luz o temperatura que impiden ocurra la germinación. Una vez que se eliminan los factores limitantes puede darse la germinación.

Bewley y Black (1994) distinguen dos tipos de latencia basándose en características intrínsecas de las semillas más que en las del medio ambiente.

1. Latencia embrionaria: Se trata de un bloqueo profundo en la germinación de la semilla dependiente de inhibidores químicos producidos por el embrión.
2. Latencia impuesta por los tegumentos: En esta latencia la testa, endospermo, pericarpo o algún órgano extrafloral impiden la germinación de la semilla.

Baskin y Baskin (1998) complementaron la clasificación de Nikolaeva (1969, citado en Baskin y Baskin, 1998) y propusieron los siguientes tipos de latencia:

- Latencia fisiológica. Es provocada por un mecanismo de inhibición fisiológica del embrión.
 - 1.- Latencia superficial o no profunda: Es causada por las estructuras de protección del embrión, estas estructuras pueden restringir el paso de oxígeno hacia el embrión o contener sustancias inhibidoras de crecimiento.
 - 2.- Latencia intermedia. Este tipo de latencia se pierde cuando las semillas son sometidas a tratamientos de estratificación, de ácido giberélico o mediante la remoción del pericarpo.
 - 3.- Latencia profunda. Para romper esta latencia se requieren tratamientos de estratificación de larga duración, tratamientos con ácido giberélico no rompen este tipo de latencia.

- Latencia morfológica. Se da en semillas que al momento de la dispersión no cuentan con un embrión maduro, estando la semilla constituida en su mayor parte por el endospermo.
- Latencia física. Se da cuando las semillas presentan una testa impermeable con una capa de células lignificadas.
- Latencia química. Ocurre ante la presencia de inhibidores químicos de la germinación, que pueden encontrarse en el embrión, el endospermo o en la testa.
- Latencia mecánica. Está determinada por la presencia de una testa dura leñosa que puede o no ser impermeable, esta latencia puede romperse mediante la remoción de la testa o tratamientos de estratificación.

Germinación y desarrollo temprano en plantas acuáticas

Las semillas de la mayoría de las plantas acuáticas presentan grandes periodos de latencia, esta característica se debe principalmente a que el embrión es aprisionado mecánicamente por el pericarpo y a que el extremo micropilar suele estar fuertemente sellado por tejido funicular. Para que ocurra la germinación es necesario que el tapón formado por el tejido funicular sea retirado, que el endocarpo se rompa o se desgaste permitiendo la entrada de agua al embrión, lo que promueve la germinación (Sculthorpe, 1985). Por lo que podrían considerarse ortodoxas. Baskin y Baskin (1998) plantean que las semillas de varias especies acuáticas pueden ser latentes condicionales, pudiendo presentar latencia fisiológica, latencia física o latencia morfofisiológica.

A pesar de que la desecación de las semillas puede provocar la ruptura del endocarpo o de la testa e inducir la germinación, en algunas especies puede reducir la viabilidad. Las semillas de muchas especies acuáticas mantienen su viabilidad por muchos años cuando son mantenidas en cuartos frescos o a

bajas temperaturas. Los periodos de viabilidad de semillas de plantas acuáticas pueden ir desde semanas hasta cientos de años. Algunos géneros tropicales presentan semillas vivíparas, es decir que no presentan periodos de latencia y la semilla puede comenzar a germinar antes de haberse roto el pericarpo e incluso antes de liberarse de la planta madre (Sculthorpe, 1985).

El oxígeno también juega un papel importante en la inducción o ruptura de la latencia en algunas especies de plantas acuáticas (Baskin y Baskin, 1998).

En plantas acuáticas marinas se han reportado más trabajos de germinación. *Zostera capricorni* es una especie de pasto marino en la que se ha determinado que los factores ambientales que intervienen en el proceso germinativo son principalmente la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (Brenchley *et al.*, 1999).

En experimentos en laboratorio Orth y Moore (1983), determinaron que en *Zostera marina* no había influencia de la salinidad del agua sobre la germinación. Además reportaron que la temperatura tiene un efecto sobre el crecimiento de las plántulas.

Mc Millan (1987) estudió la germinación y la morfología de plántulas de *Halophila engelmanni* encontrando que sus semillas germinan después de 3 a 4 semanas de haber sido colectadas de la planta madre, además, observó que la luz tiene un efecto muy importante en el rompimiento de la latencia endógena. En este mismo trabajo, describe el desarrollo temprano de la plántula, indicando que se inicia por el surgimiento del hipocótilo en el extremo opuesto a los cotiledones. Posteriormente la radícula se desarrolla de la base del hipocótilo y aparecen pelos unicelulares en la superficie de éste. A continuación se desarrollan pelos radiculares en la raíz, seguido por la elongación del extremo cotiledonario, el surgimiento de la primera hoja verdadera en el extremo cotiledonario y el surgimiento de una raíz lateral que se elonga. Las siguientes 3 hojas surgen de la vaina de la hoja anterior.

Generalidades de la familia Podostemaceae

La familia Podostemaceae es la más grande de las angiospermas estrictamente acuáticas (Philbrick y Novelo, 2004), comprende 48 géneros y 270 especies (Kholza *et al.*, 2000). Las podostemáceas habitan en ríos rápidos o cascadas (Philbrick y Novelo, 1993) y se encuentran firmemente ancladas al sustrato rocoso (Murguía-Sánchez *et al.*, 2002). Estudios realizados por Jäger-Zürn y Meinhard (2000) plantearon que las podostemáceas presentan un biofilm (capa) de cianobacterias y dependen también de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), secretadas por éstas, que cubren el sustrato sólido para adherirse a las rocas. Se ha considerado que este biofilm provee a la planta de un micronicho que les permite establecerse y crecer sobre un sustrato rocoso (Morris y Monier, 2003).

La familia se caracteriza por tener un alto grado de endemismo, ya que aproximadamente 48% de sus especies se distribuyen sólo en ciertas cascadas o corrientes rápidas (Philbrick y Novelo, 1995; 1998). Pero debido a malos muestreos, colecciones pobres y a imprecisiones taxonómicas, ha sido difícil hacer una interpretación certera de este aparente endemismo (Philbrick y Novelo, 1995). Un ejemplo de estas complicaciones taxonómicas es el caso de *Marathrum rubrum* y *M. schiedeanum*, Novelo y Philbrick (1993) determinaron, con base en caracteres morfológicos, que se trataban de dos especies diferentes. Sin embargo, Luna (2006), basándose en la biología reproductiva de estas especies plantea la posibilidad de que se traten en realidad de dos ecotipos de una misma especie.

La importancia ecológica de la familia Podostemaceae radica en que son indicadores de la contaminación de ríos, y a que proveen un micronicho a especies de invertebrados y peces (Quiroz *et al.*, 1997, Hutchens *et al.*, 2003, Marcineck *et al.*, 2003),

En la mayoría de las especies la duración del ciclo de vida de las plantas es anual; algunas son perennes debido a que permanecen sumergidas en el agua. Su morfología varía de forma notable, ya que cuando no han desarrollado los

órganos reproductivos pueden ser parecidas a líquenes, algas, musgos, briofitas u otras plantas (Uedal *et al.*, 1997).

La dinámica evolutiva ha llevado a esta familia de plantas a desarrollar adaptaciones morfológicas que les permiten soportar el estrés mecánico al que están sujetas debido a los lugares que habitan, hecho que impide que encajen idealmente en el modelo convencional hoja-tallo. A pesar de que dichas modificaciones presentan muchas variaciones, en general las podostemáceas presentan raíces fotosintéticas, crecimiento tipo taloide, reducción o pérdida de la cofia, desarrollo de rizoides o raíces adherentes, ausencia de aerénquima y cuerpos de sílice en las células epidérmicas (Rutishauser, 1997).

Existe una controversia en cuanto a la naturaleza morfológica del cuerpo vegetativo taloide en Podostemaceae debido a que hay un alto nivel de variación entre los miembros de toda la familia. La interpretación que se le ha dado a la morfología vegetativa es muy diversa. Sehgal *et al.* (2002) utilizan el término “talo” con un sentido descriptivo sin implicar homologías con los musgos. Sin embargo Jäger-Zürn (1997) hace una comparación morfológica de las estructuras vegetativas de *Tristicha trifaria*, *Indotristicha ramosissima* y *Dalzellia ceylanica*, donde identifica las tendencias generales en el desarrollo de estas especies y las compara con características morfológicas de otras angiospermas, encontrando que la construcción vegetativa en estas especies no difiere de la de otras dicotiledóneas y que, por tanto, es válido aplicar el modelo raíz-tallo en estas especies. Jäger-Zürn cuestiona también el uso del término “talo” en Podostemaceae argumentando que la apariencia taloide de estas plantas está más relacionada con la función de las estructuras que con su organización, y que el uso de este término es erróneo puesto que es utilizado para las estructuras de las talofitas.

La mayoría de las angiospermas acuáticas presentan una alta tendencia a la propagación vegetativa como adaptación resultante por la dificultad que representa tener reproducción sexual en ambientes acuáticos en términos de eficacia y economía (Grace, 1993). Hay pocos trabajos que aborden aspectos de la biología reproductiva en los que se incluya producción de semillas,

germinación y establecimiento de plántulas de podostemáceas. Philbrick y Novelo (1997) compararon el número de óvulos, así como el número y tamaño de semillas de especies de podostemáceas norteamericanas y mexicanas (*Marathrum*, *Oserya*, *Podostemum*, *Tristicha* y *Vanroyenella*), encontrando que en todas las especies la producción de semillas fue considerablemente alta, especialmente en especies anuales, ya que producen cantidades mayores respecto a las especies perennes. No encontraron diferencias interespecíficas respecto al tamaño y características de las semillas.

Dentro de la gran variación morfológica encontrada en la familia Podostemaceae, también se presentan modificaciones estructurales. A diferencia de las demás angiospermas dicotiledóneas, una vez que emerge el polo radicular de la semilla (Vidyashankari y Moham-Ram, 1987), no se forma una raíz primaria (radícula) en la punta del hipocótilo, sino que se forman raíces adherentes cuyo origen también varía entre una especie y otra (Suzuki *et al.*, 2002). Estas raíces juegan por sí mismas un papel importante en la fijación del talo en el sustrato (Sehgal *et al.*, 2002). Philbrick (1984) describió el proceso de germinación y el desarrollo fenológico de la fijación radicular en el desarrollo temprano de *Podostemum ceratophyllum*. La interpretación morfológica de las estructuras de la familia Podostemaceae ha sido controversial debido a la falta de conocimiento acerca de cómo las plántulas se desarrollan hasta llegar a ser plantas maduras.

Philbrick y Novelo (1998) estudiaron los sistemas reproductivos, fenología floral, flujo del polen y producción de semillas en *Marathrum rubrum*, encontrando que la autogamia es un componente importante en su sistema reproductivo, sin embargo, el flujo de polen también ocurre, por lo que se considera que la vía sexual es la forma principal de reproducción, tomando en cuenta que es posible encontrar grandes cantidades de semillas en esta especie.

Embriológicamente, dos de las peculiaridades de las podostemáceas son la presencia de plasmodio nucelar y la ausencia de endospermo, lo cual podría

deberse a la ausencia de doble fecundación (Jäger-Zürn, 1997; Raghavan, 2003).

Ciclo de vida

Como ya se ha mencionado, las podostemáceas crecen adheridas fuertemente al sustrato rocoso en ríos de corriente fuerte, los cuales presentan temperaturas que pueden fluctuar entre los 14° y 27° C (Quiroz *et al.*, 1997). Estos ríos son principalmente oligotróficos (con escasos nutrientes) y libres de contaminantes, aunque se ha observado que existen especies de esta familia que pueden desarrollarse en ríos contaminados (Quiroz *et al.*, 1997). Su ciclo de vida está estrechamente relacionado con el nivel del agua de los ríos en los que habitan. Durante la época de lluvias el nivel del agua sube, permitiendo el desarrollo de las estructuras vegetativas que crecen sumergidas y ancladas al sustrato rocoso. Posteriormente, cuando comienza la época de sequía y el nivel del agua empieza a disminuir las estructuras vegetativas en la mayoría de las especies comienzan a senescer, proceso que se acelera por la exposición al aire, y emergen las estructuras reproductoras; es durante esta época cuando se llevan a cabo los procesos de floración y polinización. Como resultado del evento reproductivo se forman los frutos que liberarán las semillas para posteriormente reestablecer las poblaciones (Luna, 2006).

Sistemática y filogenia

No existe hasta el momento ninguna hipótesis aceptada de manera general acerca de la posición sistemática de la familia Podostemaceae. En 1954 Royen concluyó que la familia Saxifragaceae es el grupo hermano de un complejo constituido por Rosaceae, Crassulaceae y Podostemaceae. Al establecer las relaciones filogenéticas de la familia en base a un análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *rbcL*, se determinó que Podostemaceae es grupo hermano

de Crassulaceae pudiendo haber derivado de este último (Uedal *et al.*, 1997). Stevens (citado en; Murguía, 2003) ubica a las podostemáceas en el orden Malpighiales, sin embargo se requieren más estudios morfológicos y moleculares que esclarezcan las relaciones de Podostemaceae. Savolainen *et al.* (2000), Soltis *et al.* (2000), Gustafsson *et al.* (2002) (citados en Satoshi, *et al.*, 2006) ubican también a Podostemaceae en el grupo de las Malpighiales, pero particularmente cerca de Clusiaceae (Hypericaceae).

Estudios morfológicos (Rutishauser, 1997), moleculares (Uedal *et al.*, 1997) y cariomorfológicos (Oropeza *et al.*, 2002) soportan la existencia de una división de la familia en dos subfamilias: Podostemoideae y Tristichoideae.

Dentro de la subfamilia Podostemoideae es posible encontrar un clado americano basal conformado por los géneros *Oserya*, *Vanroyenella*, *Marathrum*, *Apinagia* y *Mourera*, un clado Asiático-Australiano conformado por especies de los géneros *Cladopus*, *Hydrobryum*, *Polypleurum*, *Zeylanidium* y *Torrenticola*, y un tercer clado conformado por el género americano *Podostemum* y los géneros de Madagascar *Telethylax* y *Endocaulos*, siendo estos el grupo hermano del grupo Asiático-Australiano (Kita y Kato 2001).

La subfamilia Tristichoideae es la más pequeña de las dos subfamilias de Podostemaceae. Cinco géneros con diez especies comprenden a Tristichoideae. El género monotípico *Weddellina* (*W. squamulosa*) se distribuye en Guayana y Venezuela, *Tristicha* (*T. trifaria* y *T. australis*) es el taxón con mayor distribución en Podostemaceae: África, Madagascar y Australia, y en el nuevo mundo desde México hasta Argentina. El género *Indotristicha* (*I. ramosissima*, *I. tirunelveliana*), está restringido al suroeste de la India y Sri Lanka, *Dalzellia* comprende cuatro especies (*D. ceylanica*, *D. carinata*, *D. diversifolia* y *D. sessilis*) y se distribuye discontinuamente desde China hasta el sur de la India y Sri Lanka. *Malaccotristicha malayana* se distribuye en Malasia (Jäger-Zürn, 1997).

Los miembros de la subfamilia Tristichoideae parecen ajustarse un poco mejor al modelo raíz-tallo típico de las angiospermas, en tanto que los miembros de la

subfamilia Podostemoideae presentan una morfología que se desvía de éste, haciendo que se parezcan más a musgos o líquenes, aunque su naturaleza como angiosperma se evidencia en el momento de la floración (Sehgal *et al.*, 2002; Satoshi *et al.*, 2006).

Podostemáceas en México

En México se encuentran cinco géneros de los 19 que habitan en el Nuevo Mundo: *Marathrum*, *Oserya*, *Podostemum*, *Tristicha*, y *Vanroyenella* (Novelo y Philbrick, 1997). De estos cinco géneros, en México es posible encontrar 8 especies: *Marathrum rubrum*, *M. schiedeanum*, *M. tenue*, *Oserya coulteriana*, *O. longiflora*, *Podostemum riccifforme*, *Tristicha trifaria*, y *Vanroyenella plumosa* (Novelo y Philbrick, 1997).

M. rubrum es endémica de las partes bajas de la vertiente del Pacífico Mexicano, en los estados de Jalisco y Guerrero en altitudes de hasta 400 msnm (Novelo y Philbrick, 1997). *M. schiedeanum* es una especie distribuida ampliamente que puede encontrarse a una altitud de 1000 msnm, desde Nayarit hasta Chiapas por la costa del Pacífico y en Veracruz por el Atlántico. *M. tenue* se distribuye en las costas del Atlántico, en la zona centro y sur de la costa del Pacífico alcanzando altitudes de 1500 msnm (Novelo y Philbrick, 1997).

En México el género *Oserya* se conforma por dos especies *O. coulteriana* y *O. longifolia* (Novelo y Philbrick, 1997). *O. coulteriana* es endémica de México y se distribuye desde Sonora hasta Guerrero, en el centro de México, principalmente en Morelos y en Baja California Sur hasta los 3000 msnm. Por otro lado, *O. longifolia* también es endémica de México y sólo se conoce la localidad tipo en el estado de Jalisco (Oropeza, 1999).

Podostemum riccifforme es endémica de la vertiente Atlántica de México, en los estados de Oaxaca, Puebla, Tabasco, y Veracruz pudiendo alcanzar altitudes cercanas a los 1500 msnm (Novelo y Philbrick, 1997).

El género *Tristicha* está representado en México tan sólo por una especie, *T. trifaria*. Se distribuye desde Nayarit a Chiapas por el Pacífico y desde San Luis Potosí al suroeste de Veracruz y Tabasco por el Atlántico y Morelos, hasta una altitud de alrededor de los 1300 msnm (Novelo y Philbrick, 1997).

El género monotípico *Vanroyenella* es endémico de México y se conoce únicamente en los estados de Guerrero y de Jalisco (Oropeza, 1999).

Estudios de germinación y desarrollo temprano en podostemáceas

Se han realizado escasos estudios de germinación. Philbrick y Novelo (1994) realizaron el primer estudio comparativo sobre la biología de las semillas de podostemáceas. El objetivo principal fue conocer los requerimientos para la germinación y el tiempo de viabilidad bajo condiciones no controladas en laboratorio para cinco especies de la familia Podostemaceae: *Marathrum haenkeanum*, *M. rubrum*, *Oserya coulteriana*, *Tristicha trifaria* y *Vanroyenella plumosa*. Los frutos fueron almacenados hasta por 18 meses a una temperatura de 22° C con luz indirecta antes de la germinación. Los resultados mostraron que las cinco especies presentaron alta viabilidad (95%); que la germinación comenzó al cuarto día y que el porcentaje de germinación máximo para todas las especies se presentó al noveno día. No se registraron diferencias interespecíficas. Los datos que obtuvieron en laboratorio fueron los siguientes:

Marathrum haenkeanum. Semillas probablemente ortodoxas, con 95% de germinación después de 18 meses de almacenamiento.

Marathrum rubrum. Semillas probablemente ortodoxas, con 100% de germinación después de 18 meses de almacenamiento.

Oserya coulteriana. Semillas no recalcitrantes, con 97% de germinación después de 6 meses de almacenamiento.

Tristicha trifaria. Semillas probablemente ortodoxas, con 97 a 100% de germinación después de 18 meses de almacenamiento.

Vanroyenella plumosa. Semillas probablemente ortodoxas, con 100% de germinación después de 18 meses de almacenamiento.

En este estudio los autores señalan la importancia de estudiar la producción de semillas, dispersión y establecimiento bajo condiciones experimentales y de campo.

Vidyashankari y Moham-Ram (1987) realizaron estudios de germinación *in vitro* en *Griffithella hookeriana*, encontraron que la germinación del 100%, y que la viabilidad de las semillas, además de la supervivencia de plántulas maduras, fueron afectadas por el tiempo y las condiciones a las que se sometieron cuando se almacenaron. El éxito de ésta metodología proporcionó una excelente oportunidad a morfólogos y ecólogos para estudiar e interpretar la estructura, desarrollo, fisiología y características adaptativas de este grupo de plantas. Estos estudios han revelado que en podostemáceas el embrión maduro carece de plúmula y la radícula no muestra zonación histológica, además de que el extremo polar (hipófisis y epífisis) pueden reconocerse sólo de manera topográfica. Sin embargo muchos aspectos generales acerca de la morfología de las plántulas y de su desarrollo hacia plantas maduras, tales como el destino del polo radicular en las plantas de forma taloide o la ontogenia del eje primario, así como su contribución a la forma adulta, sólo se conocen de manera superficial.

Los altos niveles de germinación en todas las especies, así como las características de las semillas, sugieren que la germinación no se encuentra relacionada con diferencias en la historia de vida que caracterizan a cada especie ni a su distribución (Philbrick y Novelo, 1997).

El hecho de que en Podostemaceae los requerimientos de su fase reproductiva se parezcan a los de sus parientes terrestres, y que la vía de reproducción principal sea mediante la semilla, parece reflejar su origen terrestre más que su existencia acuática actual, considerando que la reproducción sexual es fundamental en su biología, comparada con la poca sexualidad en otras angiospermas acuáticas (Philbrick y Novelo, 1993; Philbrick y Novelo, 1997). Es posible predecir que la germinación en condiciones naturales ocurre

rápidamente, dentro de las primeras dos semanas del periodo de lluvias, cuando suben los niveles del agua en los ríos (Philbrick y Novelo, 1994).

Justificación

Debido a la importancia ecológica que tienen las podostemáceas, y a que muchas especies se encuentran amenazadas por el deterioro de los ríos en los que habitan, es indispensable conocer más sobre su biología y en este caso sobre su germinación y establecimiento temprano de plántulas, por lo que es necesario llevar a cabo estudios que colaboren a la comprensión de estos procesos fundamentales en el desarrollo de estas especies, que generen información que apoye el entendimiento de otros aspectos biológicos tales como su ecología y evolución.

Objetivos

General:

Conocer el comportamiento germinativo de las semillas y desarrollo temprano de plántulas de *Oserya coulteriana*.

Particulares:

1. Evaluar la influencia de la calidad de luz y de la temperatura constante y alternante en la germinación de semillas de *O. coulteriana*.
2. Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación de semillas de *O. coulteriana*.
3. Estudiar la morfología del desarrollo temprano de plántulas de *O. coulteriana*.

Hipótesis

H_{01} : Las semillas de *O. coulteriana* no tienen requerimientos específicos de luz ni de temperatura para la germinación.

H_{a1} : Las semillas de *O. coulteriana* tienen al menos un requerimiento de luz o temperatura para la germinación.

H_0 : El tiempo de almacenamiento no influye en la viabilidad de las semillas.

H_a : El tiempo de almacenamiento sí influye en la viabilidad de las semillas.

Distribución de la especie

Oserya coulteriana es endémica de México y se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde Sonora hasta Guerrero, y en Baja California Sur. La especie puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm (Figura 3).

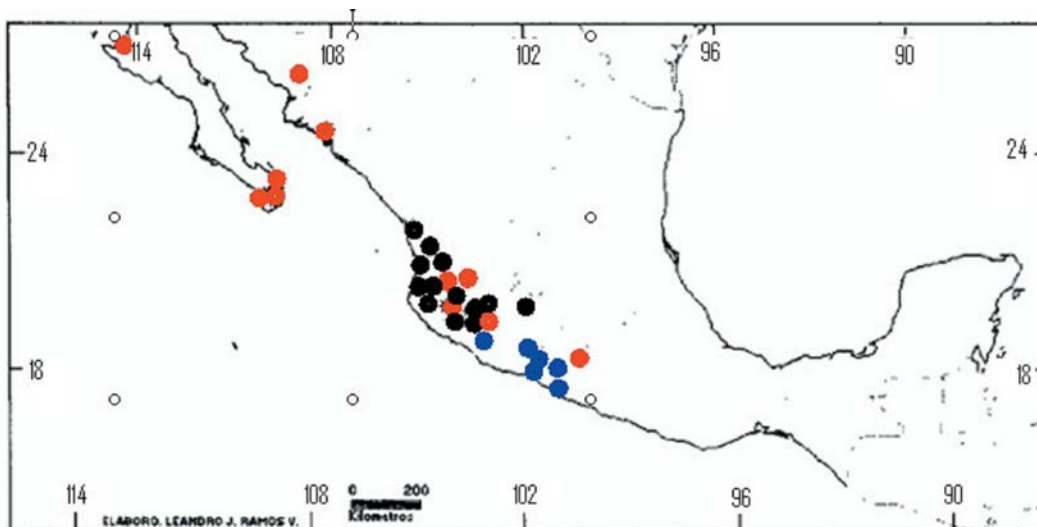


Figura 3. Mapa de la zona central y sur de México, señalando la distribución de *O. coulteriana*. Los puntos negros corresponden a colectas realizadas por Royen (1954), los puntos rojos corresponden a colectas realizadas posteriormente a las de Royen (1954) por autores no indicados y los puntos azules corresponden a colectas realizadas por Novelo y Philbrick (1997). Tomado y modificado de Novelo y Philbrick, 1997.

Método

Sitio de estudio

Se seleccionó como zona de estudio, con base en la abundancia de individuos de *O. coulteriana*, el río Horcones que se encuentra ubicado a 27 km al sur de Puerto Vallarta en el municipio de Cabo Corrientes, Jalisco, a 350 msnm, con coordenadas 20° 27' 45'' N, 105° 17' 30'' W (Figuras 4 y 5).

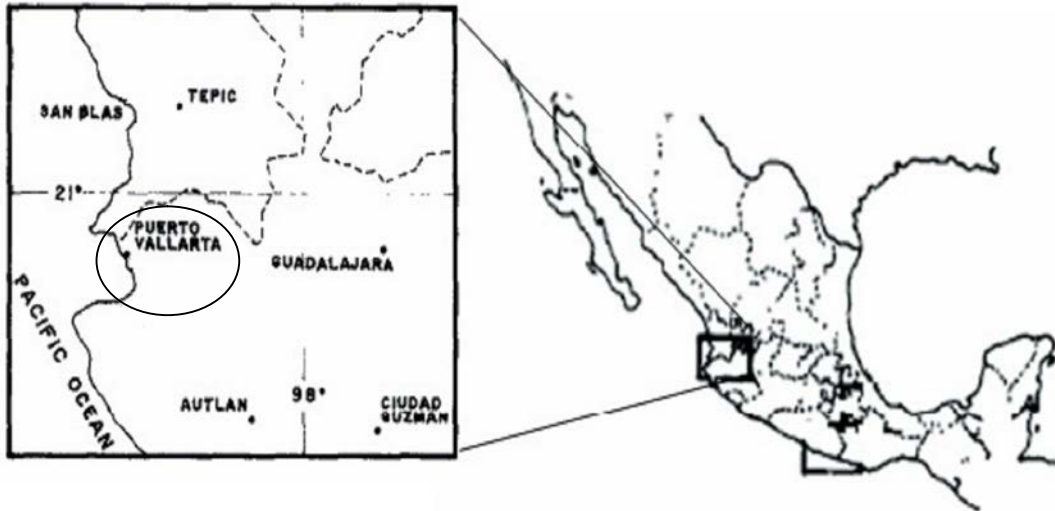


Figura 4. Mapa de la zona central y sur de México, ubicando la Ciudad de Puerto Vallarta (Tomada de Quiroz *et al.*, 1997)



Figura 5. Mapa que ilustra la ubicación del río Horcones. La cruz indica la ubicación de la localidad de estudio. Tomado y modificado de Google Earth.

Colecta de frutos.

Se realizaron dos colectas de campo, la primera en Noviembre de 2005 y la segunda en Febrero de 2006, en cada una se colectaron aleatoriamente 20 frutos de diferentes rocas, se guardaron en bolsas de papel estroza que se trasladaron al laboratorio donde se extrajeron las semillas con ayuda de un microscopio estereoscópico marca Zeizz DV4. Las semillas se almacenaron en el laboratorio en bolsas de papel estroza hasta su utilización. Adicionalmente se contó con una colecta realizada por Novelo y Philbrick en 1997. El tiempo de almacenamiento de las semillas hasta los estudios de germinación se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Tiempo de almacenamiento de semillas de *O. coulteriana* al momento de realizar los experimentos de germinación y desarrollo de plántulas en condiciones controladas. Las semillas de Noviembre 2005 y Febrero 2006 proceden de una misma cohorte.

Fecha de colecta	Tiempo de almacenamiento
1997	9 años
Noviembre 2005	8 meses
Febrero 2006	3 meses

Germinación

Se siguió la metodología descrita por Vidyashankari y Moham-Ram en 1987 para desinfectar los frutos de *O. coulteriana*, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos ya que los frutos se abrían al momento de someterlos al tren de desinfección. Debido a lo anterior se tomó la decisión de sembrar las semillas sin desinfectarlas previamente.

Los tratamientos fueron combinaciones de temperatura constante a 25° C y alternante 15-25° C, con luz blanca, roja, roja lejana y oscuridad (Diagrama 1). Para cada fecha de colecta y tratamientos se sembraron 3 grupos de 25 semillas en cajas Petri con papel Kleenex Duramax® y agua Bonafont® bajo

condiciones controladas de fotoperiodo, temperatura y calidad lumínica. Se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento.

El diseño experimental fue de 3 fechas de colecta x 2 tipos de temperatura x 4 calidades de luz x 3 repeticiones (cada una de 25 semillas).

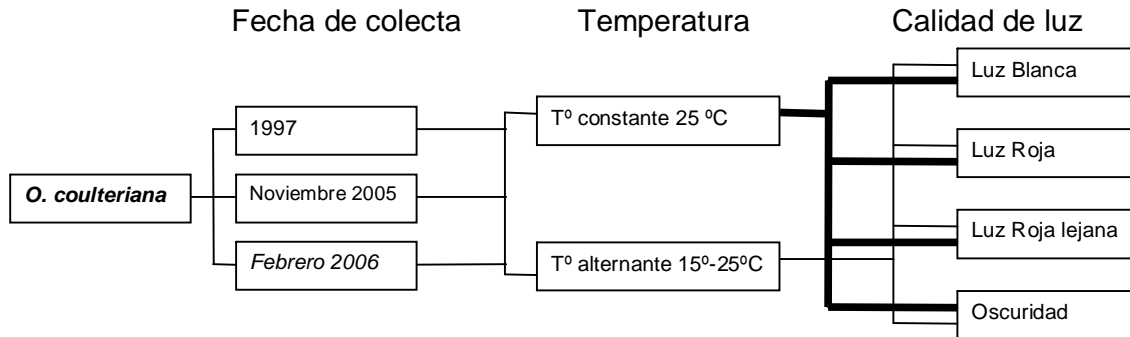


Diagrama 1. Tratamientos térmicos y lumínicos combinados en los experimentos de germinación de *O. coulteriana*.

Tratamientos de luz:

1. Luz blanca: Las cajas Petri se colocaron directamente, sin ningún tipo de filtro (R:FR= 1.73).
2. Luz roja: Las cajas Petri se colocaron en una caja de acrílico plexiglass con filtro para luz roja (R:RL= 5.22).
3. Luz Roja Lejana: Las cajas Petri se colocaron en una caja de acrílico plexiglass con filtro para luz roja lejana (R:RL=0.05).
4. Oscuridad: Las cajas Petri se envolvieron completamente en papel aluminio.

Durante estos tratamientos las cajas del experimento a temperatura constante se colocaron en cámaras de ambiente controlado Biotronette 84 (Labline Instruments). El fotoperiodo empleado en ambos casos fue de 16/8.

El seguimiento diario de la germinación se realizó sólo en el tratamiento de luz blanca ya que debido al pequeño tamaño de las semillas (226 μm de ancho por 340 μm de largo, según Philbrick y Novelo, 1997) la observación debía hacerse con microscopio estereoscópico. Por ello se tomó como parámetro para determinar el momento para el conteo del porcentaje final de germinación en

los tratamientos de luz roja, roja lejana y oscuridad cuando la germinación en luz blanca se estabilizó.

Se consideró como semilla germinada aquella en la cual el polo radicular emergió de la cubierta seminal. Se contabilizó diariamente el número de semillas germinadas en el tratamiento de luz blanca. Para los demás tratamientos sólo se contabilizó el número final de semillas germinadas.

De acuerdo a González-Zertuche y Orozco-Segovia (1996) se calcularon las siguientes variables:

Porcentaje de germinación final: Porcentaje de semillas capaces de germinar en cada tratamiento.

Porcentaje de germinación acumulada: Muestra la máxima capacidad de germinación y el tiempo en que se alcanza, la forma en que se incrementa la germinación así como su tiempo de inicio, así como su distribución en el tiempo.

Porcentaje de germinación diaria: Muestra el número de semillas que germinan cada día, describe la distribución de la germinación en el tiempo, por lo que se observa que tanto se acerca a una distribución normal y el día en que se logra el máximo pico de germinación.

Efecto del tiempo de almacenamiento.

Cuando no se registró germinación en alguna colecta, se realizó una prueba de viabilidad con fenoftaleína de la siguiente manera: 24 horas antes de realizar la prueba se colocaron 150 semillas sobre toallas de papel absorbente para llevar a cabo el proceso de imbibición. Posteriormente se añadió 1 mL de K_2CO_3 al 2% + dos gotas de fenoftaleína a cavidades de 2 mL de capacidad en charolas de plástico. Debido al tamaño de la semilla se colocaron 10 en cada cavidad,

dejando una cavidad de cada charola sin semillas de modo que sirviera de referencia para comparar el cambio de color. Se incubaron las charolas 2 horas a 35-40° C en una estufa marca Riossa modelo ED-51. Se consideró que las semillas eran viables cuando la solución de color fucsia se tornó incolora. (modificada de López-Curto *et al.*, 2005).

Desarrollo morfológico

Se siguió el desarrollo morfológico de plántulas obtenidas de los experimentos de germinación, las que se observaron y se fotografiaron con microscopía estereoscópica y electrónica de barrido. Debido a lo difícil del mantenimiento de las plántulas en condiciones de laboratorio, las fases de desarrollo se analizaron en diferentes individuos a partir de su germinación hasta los 30 días después de la siembra, edad a la cual las plántulas comenzaron a mostrar señales de degeneración, como pérdida de pigmentos y de vigor. Las plántulas que se revisaron con microscopía estereoscópica se observaron en vivo con la ayuda de un microscopio Zeiss modelo DV4.

Las plántulas revisadas con Microscopía Electrónica de Barrido se fijaron en FAA (López-Curto *et al.*, 2005) y se deshidrataron gradualmente en series de etanol, una vez deshidratado el material se llevó a punto crítico para secarlo, se montó en porta muestras de aluminio y fue cubierto con una capa de oro. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio electrónico Phillips 501-B a 15kV en la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Análisis de los resultados

Para realizar el análisis estadístico de los datos de germinación final, germinación acumulada y germinación diaria, los porcentajes de germinación obtenidos se transformaron al arcoseno con el objetivo de normalizarlos y llevar a cabo un análisis de varianza. Se realizó un ANOVA multifactorial para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento, de los tratamientos de luz y temperatura, así como el efecto de sus interacciones sobre los porcentajes de germinación. Cuando el ANOVA registró diferencias significativas se realizó un

análisis de comparaciones múltiples con la prueba de Tukey. Se utilizó el programa Statistics versión 6.0 con nivel de significancia $\alpha= 0.0005$, y para elaborar las gráficas el programa Sigma Plot versión 9.

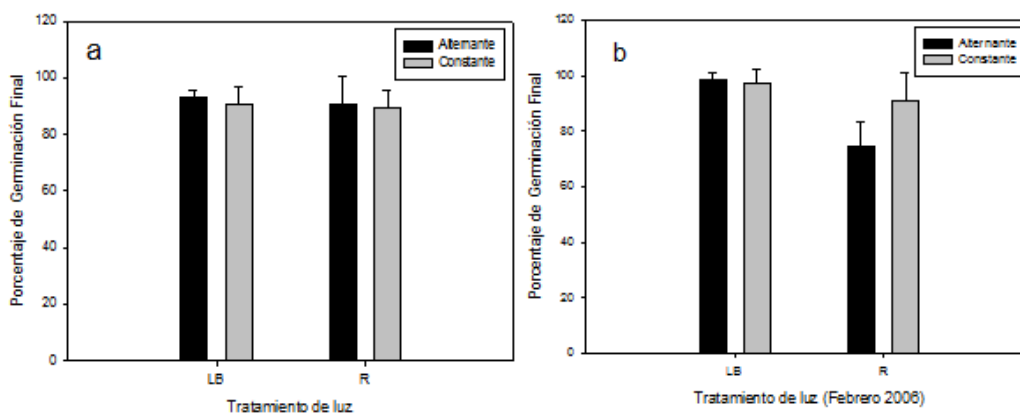
Resultados

GERMINACIÓN

En la colecta de 1997 no se registró germinación en ningún tratamiento de temperatura ni luz a los 20 días después de la siembra.

1. Germinación final

Sólo se presentó germinación en los tratamientos de luz blanca y roja en ambas fechas de colecta (Noviembre 2005 y Febrero 2006) y tratamientos de temperatura (Gráfica 1). En estos casos el porcentaje de germinación final fue alto (mayor a 70%). Se registraron diferencias significativas entre calidades de luz ($F= 6.569$; $p= 0.0208$) y la interacción luz-fecha de colecta ($F= 5.171$; $p=0.037087$) (Anexo 1).



Gráfica 1. Porcentaje final de germinación de semillas de *O. coulteriana* en los tratamientos de temperatura constante y alternante en luz roja y roja lejana. a) Colecta Noviembre 2005, b) colecta Febrero 2006.

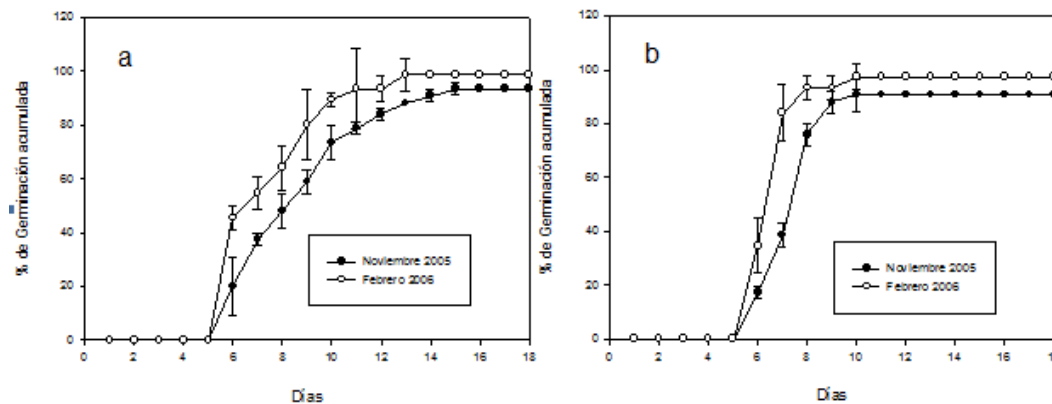
En la colecta de Noviembre de 2005 el valor en luz blanca fue de 90.6% a temperatura constante y de 93.3% a temperatura alternante. En luz roja los valores fueron de 89.3% y 90.6% respectivamente para temperaturas constante y alternante (Gráfica 1a).

En la colecta de Febrero de 2006 el valor en luz blanca fue de 97.3% a temperatura constante y de 98.6% a temperatura alternante. En luz roja los valores fueron de 90.6% y 74.6%, para temperaturas constante y alternante, respectivamente (Gráfica 1b). El análisis de Tukey indicó diferencias significativas en los porcentajes de germinación final ($p=0.0377$) en las colectas

de Febrero 2006 a temperatura alternante, entre luz roja (74.6%) y luz blanca (98.6%) (Anexo 2).

2. Germinación acumulada

La germinación comenzó en todos los casos el día 6 después de la siembra. La germinación máxima a temperatura alternante fue a los 15 días en la colecta de Noviembre 2005 (93.3%) y a los 13 días en la de Febrero 2006 (98.6%) (Gráfica 2a). Mientras que la máxima a temperatura constante se alcanzó a los 10 días después de la siembra en ambas colectas (90.6% en la colecta de Noviembre 2005 y 97.3% en la colecta de Febrero 2006) (Gráfica 2b).



Gráfica 2. Porcentaje de germinación acumulada de *O. coulteriana* en las colectas de Noviembre 2005 y Febrero 2006. a) Tratamiento de temperatura alternante. b) Tratamiento de temperatura constante.

Se registraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación acumulada por efecto de la temperatura ($F= 9.0175$; $p = 0.0031$) (Anexo 3). El análisis de Tukey detectó que esta diferencia ($p=0.0031$) se dio entre los tratamientos de temperatura constante y alternante en la colecta de Noviembre 2005 (Anexo 4).

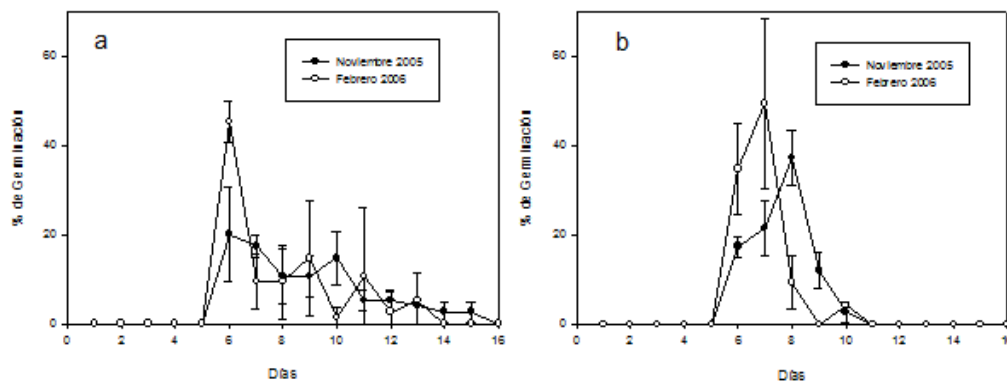
3.- Germinación diaria

El pico de germinación de semillas sometidas al tratamiento de temperatura alternante se registró el día 6 después de la siembra, un día después de haber iniciado la germinación, tanto en la colecta de Noviembre 2005 (17.3%), como en la de Febrero de 2006 (45.3%) (Gráfica 3 a).

Las semillas colectadas en Noviembre 2005, bajo tratamiento de temperatura alternante, presentaron un segundo pico de germinación el día 10 (14.6%); y las de Febrero de 2006 en el mismo tratamiento de temperatura presentaron tres picos germinativos más: los días 9 (14.6%), 11 (10.6%) y 13 (5.3%).

El pico de germinación de las semillas sometidas al tratamiento de temperatura constante fue el día 8 después de la siembra en la colecta de Noviembre 2005 (37.3%), mientras que fue el día 7 en la colecta de Febrero 2006 (49.3%) (Gráfica 3 b), dos y tres días, respectivamente, de haber iniciado la germinación.

La distribución de la germinación de las semillas en el tiempo fue intermitente en los tratamientos a temperatura alternante, con poca uniformidad, especialmente en la colecta de Noviembre de 2006; mientras que en los tratamientos a temperatura constante fue continua y más uniforme en ambas colectas.



Gráfica 3. Porcentaje de germinación diaria de semillas de *O. coulteriana* en las colectas de Noviembre 2005 y Febrero de 2006. a) Tratamiento de temperatura alternante, b) Tratamiento de temperatura constante.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación diaria ni entre tratamientos de temperatura ni entre fecha de colecta (Anexo 5).

Efecto del tiempo de almacenamiento

Como se indicó anteriormente las semillas colectadas en 1997 no germinaron, y en la prueba de viabilidad mostraron resultados negativos. Las semillas de las colectas de Noviembre 2005 y Febrero 2006 fueron viables, como se demuestra en los resultados de germinación.

Patrón de germinación y desarrollo de plántulas

Microscopía estereoscópica

Una vez que se humedece la semilla (Fig. 5a), las células de la testa secretan un tejido mucilaginoso que fija las semillas al sustrato. Posteriormente la cubierta seminal se rompe y surge el polo radicular de la plántula (Fig. 5b). A continuación surge el hipocótilo impulsado por los 2 cotiledones que se elongan (Fig. 5c). Continúa el crecimiento de los cotiledones al mismo tiempo que se desarrollan raíces adherentes y la cubierta seminal se mantiene unida al ápice de los cotiledones (Fig. 5d). Estas raíces se fijan fuertemente al sustrato, haciendo que la plántula tome una disposición erecta respecto al mismo (Fig. 5e). A continuación, surge un primer primordio foliar entre los cotiledones (Fig. 5f). Más adelante, las raíces adherentes se hacen más evidentes, al mismo tiempo surge un segundo primordio foliar y el primero ya tiene mayor longitud (Fig. 5g). Ambos primordios foliares continúan creciendo hasta alcanzar la misma longitud que los cotiledones, y posiblemente tengan una disposición alterna (Fig. 5h).

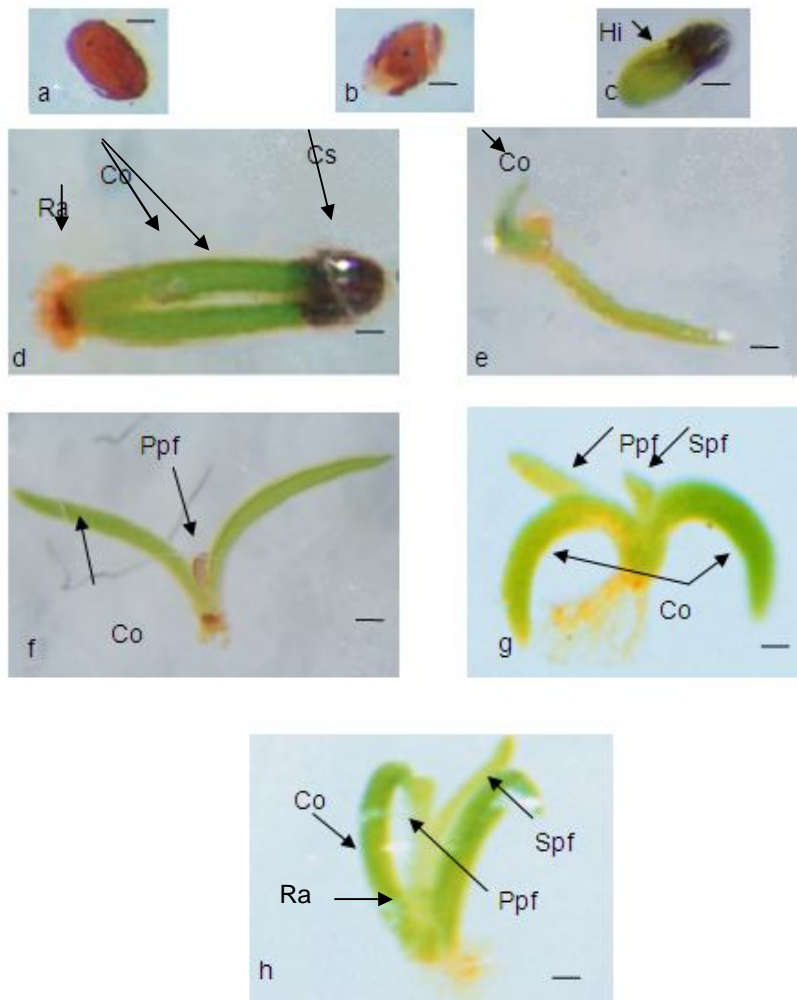
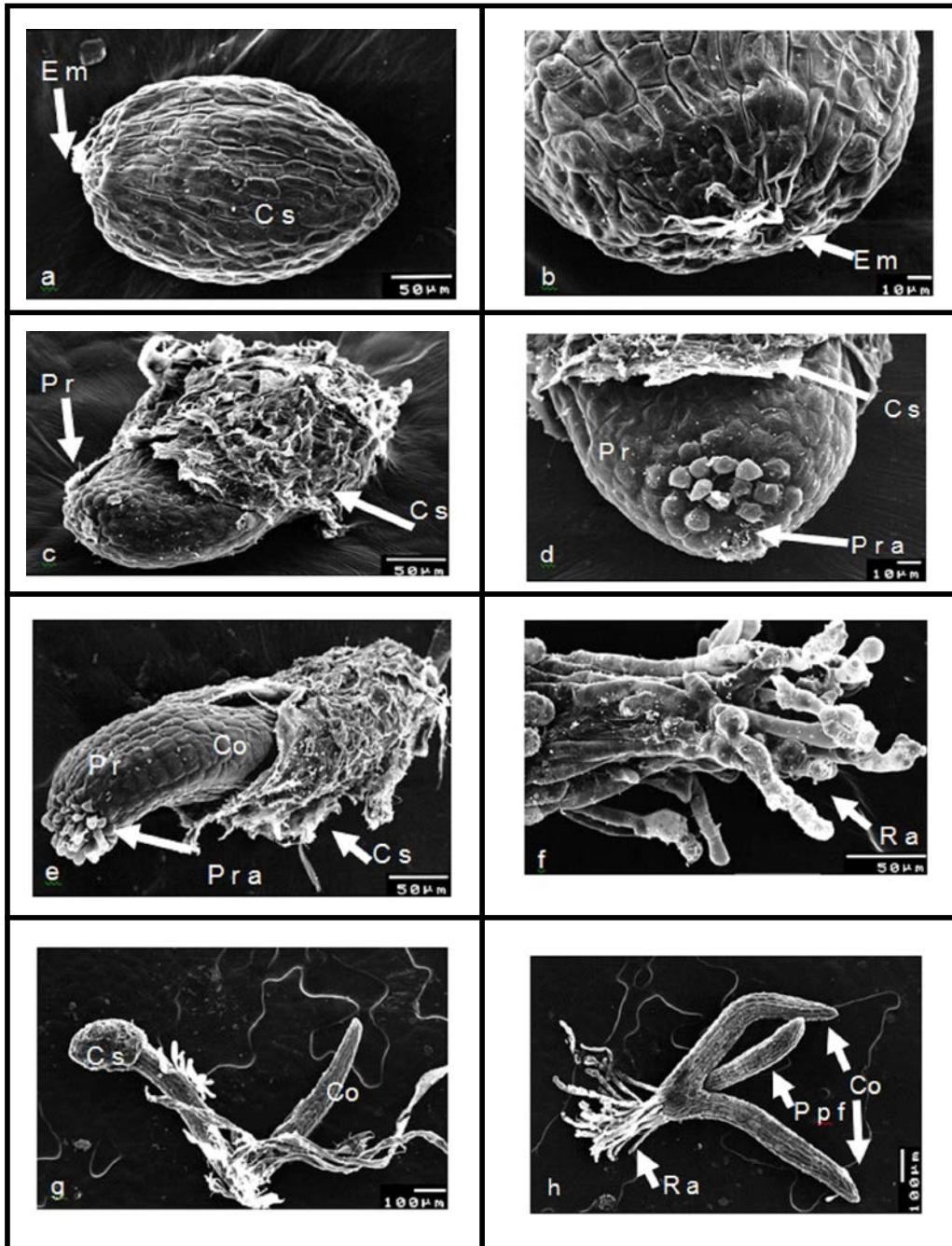


Figura 5. Patrón de germinación de semillas y surgimiento de estructuras en el desarrollo de plántulas de *O. coulteriana*. La barra equivale a 130 μ m. a) Semilla sin germinar hidratada, b) Semilla germinada, aparición del polo radicular, c) surgimiento del hipocótilo impulsado por los 2 cotiledones que se elongan, d) las raíces adherentes se hacen evidentes, continúa el crecimiento de los cotiledones, e) liberación de los cotiledones de la cubierta seminal, las raíces se fijan al sustrato y las plántulas se van disponiendo de manera perpendicular a la superficie de éste, f) surgimiento del primer primordio foliar, g) surgimiento de un segundo primordio foliar y, h) elongación de los primordios foliares. (Co) Cotiledones, (Cs) Cubierta seminal, (Hi) Hipocótilo, (Ppf) Primer primordio foliar, (Ra) Raíces adherentes, (Spf) Segundo primordio foliar.

Microscopía Electrónica de Barrido

El estudio con microscopía electrónica de barrido permitió tener un mayor acercamiento al patrón de desarrollo (Fig. 6). Respecto a la descripción con microscopía estereoscópica se destaca la presencia de tricomas (Fig. 6i) que se desarrollan sobre los cotiledones así como en las puntas de los primordios foliares.



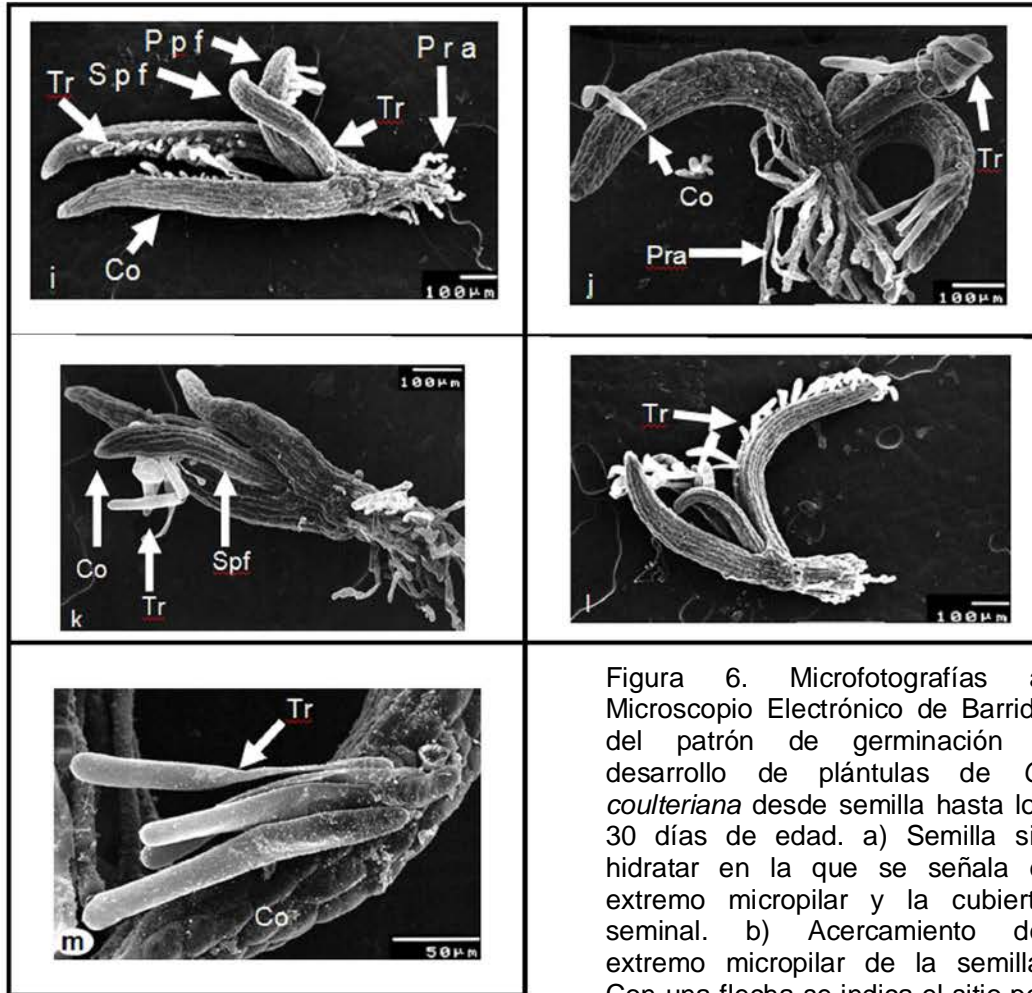


Figura 6. Microfotografías al Microscopio Electrónico de Barrido del patrón de germinación y desarrollo de plántulas de *O. coulteriana* desde semilla hasta los 30 días de edad. a) Semilla sin hidratar en la que se señala el extremo micropilar y la cubierta seminal. b) Acercamiento del extremo micropilar de la semilla. Con una flecha se indica el sitio por el cual emerge la radícula. c) Surgimiento del polo radicular.

La cubierta seminal se abre por el extremo micropilar exponiendo el polo radicular del embrión. d) Inicio de la diferenciación de los primordios de raíces adherentes a partir de células de la base del polo radicular, que inician su elongación. e) Elongación de los cotiledones. Los cotiledones se alargan empujando al embrión fuera de la cubierta seminal. Continúa la elongación de los primordios de raíces adherentes. f) Elongación de las raíces adherentes. g) Los cotiledones continúan creciendo, lo que provoca que la cubierta seminal se vaya desprendiendo, liberándose de ésta. h) Surgimiento del primer primordio foliar, lo que ocurre al mismo tiempo que se elongan los cotiledones. i) Surgimiento del segundo primordio foliar en posición opuesta al primero y adyacente a los cotiledones. Empiezan a desarrollarse tricomas tanto en los cotiledones como en los primordios foliares. j) Incremento en longitud de tricomas y de las raíces adherentes. k) Los primordios foliares se elongan hasta alcanzar una longitud similar a la de los cotiledones. l). Crecimiento de tricomas a lo largo de los cotiledones, así como en las puntas de ambos primordios foliares. m) Acercamiento de los tricomas que surgen de los cotiledones. (Co) cotiledones, (Cs) Cubierta seminal, (Em) Extremo micropilar, (Pr) Polo radicular, (Ppf) Primer primordio foliar, (Pra) Primordio de raíz adherente, (Ra) Raíces adherentes, (Spf) Segundo primordio foliar. (Tr) Tricomas.

Discusión

Germinación

- **Germinación final**

Efecto de la luz

Debido a que sólo se encontró germinación en los tratamientos de luz blanca y luz roja, se corroboró lo reportado por Philbrick y Novelo (1994) quienes, en condiciones no controladas, encontraron que las semillas de *O. coulteriana* son fotoblásticas positivas. A pesar de que las diferencias no resultaron significativas se observó que los porcentajes de germinación final de las semillas que estuvieron en luz roja fueron siempre iguales o menores, nunca mayores, a las que estuvieron en luz blanca.

Efecto de la temperatura

No hubo efecto de las temperatura sobre la germinación de *O. coulteriana*, sin embargo se destaca que la colecta de Febrero 2006 en luz roja a temperatura alternante tuvo el menor valor de todos los tratamientos. Philbrick y Novelo (1994) encontraron valores similares de germinación (97%) en esta especie a temperatura constante de 22° C, y porcentajes entre 97% y 100% en especies como *Marathrum haenckeanum*, *M. rubrum*, *Tristicha trifaria* y *Vanroyenella plumosa*, interactuando las tres últimas con *O.coulteriana* en la misma localidad de estudio.

Efecto de la interacción luz-edad de la semilla

Hubo efecto del tratamiento de luz sobre las semillas de tres meses de edad (Febrero 2006) en temperatura alternante ya que se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes finales obtenidos entre luz blanca y roja. Dado que la luz afecta de manera diferencial la germinación de semillas de diferentes edades, se podría considerar que semillas más jóvenes responden mejor a longitudes de onda roja y que conforme van envejeciendo ajusten sus requerimientos a longitudes de onda blanca. A pesar de esto, cabe resaltar que este efecto sólo se observó en semillas de tres meses de edad a temperatura

alternante, y la interpretación de éste resultado debe ser cautelosa ya que podría ser una respuesta aleatoria.

Los porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos de luz blanca y temperatura constante concuerdan con los obtenidos por Philbrick y Novelo (1994), quienes encontraron que con un tiempo de 6 meses de almacenamiento el porcentaje de germinación final de *O. coulteriana* fue del 97%.

- **Germinación acumulada**

Inicio de la germinación

En todos los tratamientos en luz blanca, la germinación comenzó el día 6 después de la siembra, este comportamiento es muy importante ya que posibilita un establecimiento temprano de las plántulas, independientemente del destino que éstas tengan posteriormente. Philbrick y Novelo (1994) encontraron que la germinación de *O. coulteriana* comenzó el día 4 a temperatura constante y luz blanca, mientras que Vidyashankari y Moham-Ram (1987) obtuvieron que en *Grifithella hookeriana* la germinación comenzó al segundo día, en condiciones similares.

Efecto de la temperatura

La temperatura tuvo un efecto en el porcentaje de germinación acumulada en la colecta de Noviembre de 2005 (8 meses de edad), ya que a temperatura constante el máximo valor se alcanzó más pronto que a temperatura alternante, a los 10 y 15 días (respectivamente) después de la siembra. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la colecta de Febrero 2006 (3 meses de edad), presentaron un comportamiento similar, alcanzando el porcentaje máximo a temperatura constante a los 8 días y en alternante a los 11 días después de la siembra. Estos resultados indican la velocidad de germinación ya que, independientemente de la edad de la semilla, a temperatura constante se alcanza más rápido el porcentaje de germinación máximo respecto a la temperatura alternante.

Tiempo de almacenamiento

A pesar de que estadísticamente no se detectó un efecto del tiempo de almacenamiento sobre el porcentaje de germinación acumulada, en las semillas colectadas en Noviembre de 2005 se presentó un porcentaje de germinación mayor en ambas temperaturas respecto a las de Febrero 2006, lo cual indica un efecto del tiempo de almacenamiento en el porcentaje de germinación.

- **Germinación diaria**

Temperatura y edad.

A pesar de que no hubo diferencias significativas para ningún tratamiento de temperatura ni por efecto del tiempo de almacenamiento, las semillas a temperatura constante presentaron picos de germinación similares en ambas colectas (40 y 50% en Noviembre de 2005 y Febrero de 2006 respectivamente), y el resto de la germinación se alcanzó en 3 y 4 días respectivamente. A temperatura alternante la colecta de Febrero 2006 presentó un pico máximo de 40% y la de Noviembre 2005 del 20%. El resto de la germinación se distribuyó en 7 y 9 días respectivamente.

Tiempo de almacenamiento

El hecho de que en la colecta de 1997 no se registrara germinación bajo ningún tratamiento y, que las pruebas de viabilidad fueran negativas, permite afirmar que las semillas de más de nueve años de edad, colectadas en el Río Horcones, Jalisco, no son viables. Sin embargo, en las semillas colectadas en el mismo sitio en Febrero de 2006 y Noviembre de 2005 con 3 y 8 meses de almacenamiento, respectivamente hubo una disminución del 100% al 70%, lo que indica que el tiempo de almacenamiento afecta la germinación ya que ésta disminuye con el tiempo. Philbrick y Novelo (1994) encontraron que no hay pérdida de viabilidad en semillas de *O. coulteriana* después de haber sido almacenadas por 6 meses en condiciones ambientales cuando se pusieron a germinar en luz blanca a 22°C aproximadamente. Se ha reportado que en las semillas de *Griffithella hookeriana* (Vidyashankari y Moham-Ram, 1987) no hay

una disminución de la viabilidad después de 6 meses de almacenamiento, pero que después de 12 meses, al germinarlas a 27°C y luz blanca constante, hay un decremento en la viabilidad. En *O. coulteriana* también se ha reportado un alto porcentaje de germinación a los 8 meses de almacenamiento y en *Marathrum rubrum*, *Tristicha trifaria* y *Vanroyenella plumosa* después de 18 meses de almacenamiento (Philbrick y Novelo, 1994). Hay que considerar que en estos trabajos se está analizando la longevidad potencial, pero en los reportes no se establecen las condiciones precisas de almacenamiento, por lo que no se puede hacer un análisis más profundo.

Es posible que, en cuanto a viabilidad, las semillas de *O. coulteriana* presenten un comportamiento similar al de las especies señaladas en el párrafo anterior de hasta 18 meses, y no más de 9 años, siempre y cuando los ambientes tengan las mismas características. A este respecto es muy importante estudiar la viabilidad ecológica de las poblaciones de semillas ya que las condiciones ambientales particulares de cada especie pueden influir en su respuesta.

Debe considerarse también el tipo de semilla respecto a su latencia, Philbrick y Novelo (1994) reportan, de acuerdo a los tiempos de almacenamiento y porcentajes de germinación, que las semillas de *Marathrum haenckeanum*, *M. rubrum*, *Tristicha trifaria*, *Vanroyenella* y *Oserya coulteriana plumosa* son probablemente ortodoxas. En el presente estudio se presentaron altos porcentajes de germinación y no se registró latencia innata en ninguna de las colectas de 2005 y 2006, por lo que podrían considerarse recalcitrantes.

Desarrollo

La plántula de *O. coulteriana* consiste de dos cotiledones aciculares, una plúmula muy reducida y un hipocótilo con raíces adherentes en su polo radicular. Esta morfología ha sido encontrada en todas las podostemáceas estudiadas (Rutishauser, 1997). Sin embargo, la morfología de la plúmula así como el papel del hipocótilo en la formación de raíces adventicias parece cambiar de una especie a otra (Sehgal *et al.*, 2002; Susuki *et al.*, 2002).

El patrón de eventos en el desarrollo temprano y establecimiento de *O. coulteriana* es muy parecido al de otros miembros de la subfamilia Podostemoideae que ha sido descrito por Philbrick (1984) para *Podostemum ceratophyllum* y al de los géneros *Marathrum* y *Vanroyenella* (Rutishauser, 1997).

O. coulteriana presenta, en la etapa de plántula joven, tricomas desarrollándose a lo largo de los cotiledones y en las puntas de los primordios foliares, que pueden tener un papel importante en la absorción de agua. En *Vanroyenella plumosa* (Rutishauser *et al.*, 1999) y en *Mourera fluviatilis* (Rutishauser y Grubert, 1999) han observado estructuras similares creciendo sobre las hojas, sin embargo éstas se presentan en plántulas en etapas de desarrollo más avanzadas en comparación con *O. coulteriana*.

Susuki *et al.* (2002) encontraron que no existe un meristemo apical entre los cotiledones en nueve especies de la subfamilia Podostemoideae (géneros *Cladopus*, *Hydrobryum*, *Polypleurum*, *Synstylis*, *Torrenticola*, y *Zalanidium*) y que no se forma una raíz primaria en la punta del hipocótilo, lo que al parecer sucede en *O. coulteriana*. Los autores mencionan que debe tenerse en cuenta que existen diferencias morfológicas entre plántulas obtenidas en condiciones de laboratorio en comparación con aquellas que han sido obtenidas de poblaciones naturales.

El polo radicular de *O. coulteriana* presenta coloración verde, lo que puede deberse a una probable actividad fotosintética relacionada con la ausencia de endospermo o de otros tejidos de reserva. Dado que la semilla germina sobre el sustrato, dicha capacidad puede ser usada por la plántula inmediatamente después de que emerge de la cubierta seminal (Philbrick, 1984).

En *O. coulteriana* no se forma una raíz primaria, al menos hasta los 30 días de edad, en el extremo final de la radícula, en cambio se desarrollan raíces adherentes. Estudios realizados por Seghal *et al.* (2002) en *Hydrobryopsis sessilis* y por Mohan-Ram y Seghal (1997) indican que estas raíces adherentes son unicelulares y que se forman a partir de células basales del polo radicular,

es posible que las raíces adherentes en *O. coulteriana* tengan el mismo origen pero son necesarios estudios anatómicos que determinen si se presenta el mismo patrón. Estas raíces adherentes además secretan un mucílago que fija la plántula firmemente al sustrato (Sehgal *et al.*, 2002) y juegan un papel de suma importancia en su establecimiento temprano ya que representan la primera forma en la que pueden soportar el estrés mecánico al que están sujetas. Sin embargo Jäger-Zürn y Meinhard (2000) plantea que las podostemáceas dependen de un biofilm de cianobacterias que cubre las rocas donde crecen para fijarse a éstas, que las raíces adherentes no secretan ninguna sustancia mucilaginoso, sino que su importancia radica en que son las estructuras que interactúan con el biofilm permitiendo que la planta se adhiera firmemente al sustrato rocoso.

Satoshi *et al* (2006) distinguen cuatro patrones de desarrollo morfológico de la raíz en Podostemaceae, y consideran que *O. coulteriana* presenta el patrón tipo 2A el cuál se distingue por tener el meristemo radicular, cofia aplanada dorsiventralmente y por tener células externas de la cofia acroscópicas, considerando que este tipo de crecimiento surgió en la evolución temprana de la subfamilia Podostemoideae.

Conclusiones

- Las semillas de *O.coulteriana* se comportaron como fotoblásticas positivas, termoblásticas y recalcitrantes.
- Las semillas de *O. coulteriana* almacenadas durante 3 y 8 meses fueron viables, no así las de 9 años de almacenamiento.
- La velocidad de germinación a temperatura constante fue mayor que a temperatura alternante independientemente de la edad de las semillas.
- La distribución de la germinación a temperatura constante se acercó más a una distribución normal que a temperatura alternante.
- La germinación a temperatura alternante fue intermitente, mientras que a temperatura constante fue periódica.
- Hasta los 30 días de edad las plántulas de *O. coulteriana* presentaron el patrón de desarrollo morfológico característico de la subfamilia Podostemoideae.

Anexos

Anexo 1. Análisis de varianza de tres vías para evaluar el efecto de los factores, luz, temperatura y colecta sobre el porcentaje final de germinación de semillas de *O. coulteriana*. En negritas se resaltan los efectos significativos.

Efecto	SS	g.l.	MS	F	P
luz	68083.77	3	22694.59	577.917	0.000000
temperatura	28.32	1	28.32	0.721	0.402070
colecta	28.86	1	28.86	0.735	0.397662
luz*temperatura	183.12	3	61.04	1.554	0.219587
luz*colecta	435.01	3	145.00	3.693	0.021733
temperatura*colecta	46.62	1	46.62	1.187	0.284018
luz*temperatura*colecta	122.94	3	40.98	1.044	0.386645
Error	1256.63	32	39.27		

Anexo 2. Análisis de Tukey para ubicar las diferencias en el porcentaje final de germinación resultado del efecto de la temperatura en semillas de *O. coulteriana*. En negritas se resaltan los resultados significativos.

	lu z	tem p	colect a	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	1	1	1		0.734406	0.999969	0.603270	1.000000	0.999898	1.000000	0.646363
2	1	1	2	0.734406		0.890554	0.999998	0.769536	0.913055	0.720792	0.057503
3	1	2	1	0.999969	0.890554		0.790040	0.999993	1.000000	0.999950	0.454274
4	1	2	2	0.603270	0.999998	0.790040		0.641593	0.822013	0.588821	0.037673
5	2	1	1	1.000000	0.769536	0.999993	0.641593		0.999969	1.000000	0.608067
6	2	1	2	0.999898	0.913055	1.000000	0.822013	0.999969		0.999847	0.419186
7	2	2	1	1.000000	0.720792	0.999950	0.588821	1.000000	0.999847		0.660686
8	2	2	2	0.646363	0.057503	0.454274	0.037673	0.608067	0.419186	0.660686	

L1: luz blanca, L2: luz roja. T1: temperatura constante, T2: temperatura alternante. C1: Noviembre 2005, C2: Febrero 2006.

Anexo 3. Análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto de los factores temperatura y colecta sobre el porcentaje de germinación acumulado de *O. coulteriana*. En negritas se resaltan los efectos significativos.

Efecto	SS	g. l.	MS	F	P
temperatura	8863.1	1	8863.1	9.0175	0.003063
colecta	23.4	1	23.4	0.0239	0.877429

temperatura*colecta	1395.5	1	1395.5	1.4198	0.235046
Error	172986.1	176	982.9		

Anexo 4. Análisis de Tukey para ubicar las diferencias en el porcentaje de germinación acumulado resultado del efecto de la temperatura en semillas de *O. coulteriana*. En negritas se resaltan los resultados significativos.

	T	C	{1}	{2}	{3}	{4}
1	1	1		0.776776	0.015967	0.114489
2	1	2	0.776776		0.182662	0.575172
3	2	1	0.015967	0.182662		0.883717
4	2	2	0.114489	0.575172	0.883717	

T1: temperatura constante, T2: temperatura alternante, C1: Noviembre 2005, C2: Febrero 2006

Anexo 5. Análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto de los factores, temperatura y colecta sobre el porcentaje de germinación diaria de *O. coulteriana*. En negritas se resaltan los efectos significativos.

Efecto	SS	g. l.	MS	F	P
Temperatura	203.96	1	203.96	1.26613	0.262026
Colecta	97.84	1	97.84	0.60736	0.436830
temperatura*colecta	38.74	1	38.74	0.24051	0.624448
Error	28351.60	176	161.09		

Bibliografía

- Baskin C. y Baskin M. 1998. Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press. E. U. A.
- Besnier F. 1989. Semillas: biología y tecnología. Mundi-Prensa, Madrid.
- Bewley J. D. 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell. 9:1055-1066.
- Bewley J. D. y M. Black. 1994. Seeds, physiology of development and germination. Plenum Press, Nueva York.
- Bidwell R. G. S. 1979. Plant physiology. Macmillan Publishing Co., Inc. Nueva York.
- Brenchley J. L. 1998. Seed germination responses to some environmental factors in the seagrass *Zostera capricorni* from Eastern Australia. Aquat. Bot. 62: 177-188.
- Cronquist A. 1997. Introducción a la Botánica. Decimo segunda edición. Editorial Continental. México.
- Esau K. 1982. Anatomía de las plantas con semillas. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- González-Zertuche L. y A. Orozco-Segovia. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. Bol. Soc. Bot. México. 58:15-30.
- Google Earth. Página en internet: www.earthgoogle.com
- Grace J. B. 1993. The adaptative significance of clonal reproduction in Angiosperms: an aquatic perspective. Aquat. Bot. 44: 159-180.
- Harper J. L. 1977. Population Biology of Plants. Academy Press. Londres.
- Hutchens J. J., J. B. Wallace y E. D. Romanizyn. 2003. The role of *Podostemum ceratophyllum* Michx. In structuring benthic macroinvertebrate assemblages in a southern Appalachian river. NorthAmerican 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 G. Meinhard. 2000. Podostemaceae Depend on Sticky Biofilms with Respect to Attachment to Rocks in Waterfalls. *Int. J. Plant Sci.* 161: 599-608.
- Kholsa C. R. Shivanna, H.Y. Moham-Ram. 2000. Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* 67: 143–154.
- Kita Y. y M. Kato. 2001. Intrafamilial phylogeny of the acuatic angiosperm Podostemaceae inferred from the nucleotide sequence of the MatK gene. *Plant Biology* 3:156-163.
- Lopez-Curto L., J. Márquez Guzmán, y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de laboratorio. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F.
- Luna R. 2006. Polinización cruzada entre dos especies del género *Marathrum* (Podostemaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F.
- Marcineck 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. Georgia. E. U. A.
- Moham-Ram H.Y. y A. Seghal, 1997. In vitro studies on developmental morphology of indian Podostemaceae. *Aquat. Bot.* 57: 97-132.
- Mc Millan C. 1987. Seed germination and seedling morphology of the seagrass *Halophila engelmanni* (Hydrocaritaceae). *Aquat. Bot.* 28: 179-188.
- Morris C. y J. Monier. 2003. The Ecological Significance of biofilm Formation by Plant associated Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 429-453.
- 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.
- Murguía-Sánchez G., A. Novelo, C. T. Philbrick y G. J. Márquez-Guzmán. 2002. Embryo sac development in *Vanroyenella plumosa*, Podostemaceae. *Aquat. Bot.* 73: 201-210.
- Novelo A. y C. T. Philbrick. 1993. A new species of *Marathrum* (Podostemaceae) from Jalisco, México. *Novon* 3:456-458.
- Novelo A. y C. T. Philbrick. 1997. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. *Aquat. Bot.* 57:275 -303.

- Novelo A. y C. T. Philbrick. 2000. Flora del Bajío y regiones adyacentes. 87. Instituto de Ecología A. C. México.
- Oropeza N. 1999. Estudios citogenéticos en cuatro géneros de la familia Podostemaceae en México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D.F.
- Oropeza N. G. Palomino, A. Novelo y C. T. Philbrick. 2002. Karyomorphological studies in *Oserya*, *Vanroyenella* and *Tristicha* (Podostemaceae sensu lato). *Aquat. Bot.* 73:163 -171.
- Orth J. R. y K. A. Moore. 1983. Seed germination and seedling growth of *Zostera marina* L. (Eelgrass) in the Chesapeake bay. *Aquat. Bot.* 15:117-131.
- Philbrick C. T. 1984. Aspects of floral biology, breeding system and seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Syst. Bot.* 9(2): 166-174.
- Philbrick C.T. y G.E. Crow. 1992. Isozyme variation and population structure in *Podostemum ceratophyllum* Michx (Podostemaceae): implications for colonization of glaciated North America. *Aquat. Bot.* 43: 311-325.
- 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. 2004. Monograph of *Podostemum* (Podostemaceae). *Syst. Bot. Monographs.* 70. The American Society of Plant Taxonomists. Michigan.
- Quiroz 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. 2003. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytologist.* 159 (3), 565–583.

- Ramirez C. 2003. Estudio comparativo de la germinación de tres especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae) que difieren en su nivel de rareza. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D.F.
- Royen P. van. 1954. Podostemaceae of the New World. Part III. Act. Bot. Neerl. 2:21-33.
- Rutishauser R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). Aquat. Bot. 57: 29-70.
- Rutishauser R. y Grubert M. 1999. The architecture of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): developmental morphology of inflorescences, flowers, and seedlings. Amer. J. Bot. 6:907-922.
- Rutishauser R., Novelo A. y Philbrick C. T. Developmental morphology of new world Podostemaceae: *Marathrum* and *Vanroyenella*. Int. J. Sci. 160(1):29-45.
- Salisbury F. B., y C. W. Ross. 1985. Plant physiology. 3ra. edición. Wadsworth Pub., E.U.A.
- Satoshi K., R. Fujinami, N. Kubo, I. Tsukamoto, R. Inagawa, R. Imaichi, y M. Kato. 2006. Comparative anatomy of root meristem and cap root in some especies de Podostemaceae and the evolution of root dorsiventrality. Amer. J. Bot. 93(5):682-692.
- Schat H. 1983. Germination ecology of some dune slack pioneers. Act. Bot. Neerl. 32(3): 203-212.
- Sculthorpe, C. 1985. The biology of aquatic vascular plants. Konigstein [Alemania del oeste] : Koeltz Scientific Books.
- Sehgal A., M. Seth y. H.Y. Moham-Ram 2002. Origin, structure and interpretation of the thallus in *Hydrobiropsis sessilis* (Podostemaceae). Int. J. Plant Sci. 163(6): 891-905.
- Sehgal A., H.Y. Moham-Ram y J.R. Bhatt 1993. In vitro germination growth, morphogenesis and flowering of an aquatic angiosperm, *Polyperurum stylosum* (Podostemaceae). Aquat. Bot. 45: 269-283.
- SEMARNAT. 2003. NOM-059-ECOL-2001. Diario Oficial de la federación 2a. sección.
- Suzuki K., Y. Kita y M. Kato. 2002, Comparative anatomy of seedlings in nine species of Podostemaceae (Subfamily Podostemoideae). Annals of Botany 89: 755-765.

- Taiz L. y E. Zeiger. 2006. Plant Physiology. 4ta ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts.
- Uedal K., Y. Hanyuda, T. 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: 87-92.
- Vázquez-Yanes C., A. Orozco-Segovia, M. Rojas-Aréchiga, M. E. Sánchez-Coronado y V. Cervantes. 1997. La Reproducción de las Plantas: Semillas y Meristemas. Fondo de Cultura Económica, México.
- Vidyashankari B. y H.Y. Moham-Ram. 1987. In vitro germination and origin of thallus in *Griffithella hookeriana*. Aquat. Bot. 28: 161-169.