



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DESARROLLO DEL GAMETOFITO MASCULINO Y
FORMACIÓN DEL TUBO POLÍNICO EN
MARATHRUM SCHIEDEANUM, PODOSTEMACEAE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN CARLOS BRAVO BELLO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ
GUZMÁN
2011**



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Bravo

Bello

Juan Carlos

57 33 80 95

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

303195856

2. Datos del tutor

Dra

Guadalupe Judith

Márquez

Guzmán

3. Datos del sinodal 1

Dra

Guillermina

Murguía

Sánchez

4. Datos del sinodal 2

Dra

Sonia

Vázquez

Santana

5. Datos del sinodal 3

M en C

Karina

Jiménez

Durán

6. Datos del sinodal 4

M en C

Felipe Ernesto

Velázquez

Montes

7. Datos del trabajo escrito

Desarrollo del gametofito masculino y

formación del tubo polínico en

Marathrum schiedeanum,

Podostemaceae

72 p

2011

AGRADECIMIENTOS

No me imagino empezar esta parte de otra manera que agradeciendo no sólo este logro sino todo lo que tengo a mi familia. A mi mamá, mi papá y mi hermano les agradezco el haberme enseñado que sólo el trabajo duro nos saca adelante, que la fuerza de voluntad, constancia y disciplina son la mejor manera de alcanzar nuestros objetivos, a ustedes, ¡GRACIAS!

Este trabajo forma parte del Proyecto PAPIIT IN206107 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), gracias a los apoyos brindados.

Ahora quisiera hacer un recuento de las personas que me ayudaron durante la realización del presente trabajo. Entonces, quiero agradecer a:

Todas las maestras del taller, porque siempre estuvieron dispuestas a resolver las dudas que surgieron durante mi aprendizaje. De manera especial a Judith, que al conocerla me contagió con su interés, ánimo y ganas de resolver cuestionamientos acerca de la que también se volvió mi familia, la Familia Podostemaceae.

Ahora bien, quiero agradecer a todas las personas que en el campo me ayudaron a organizar mi trabajo y facilitaron en varios aspectos el mismo, me refiero a Ricardo Wong que me ayudó a coleccionar, organizar el material, controlar los tiempos de polinización y tomar fotografías; a Diana, Raúl y Alfredo que por su experiencia en el trabajo con tan singulares plantas me facilitaron su manipulación y a Jenny quien también siendo su primer colecta me prestó su ayuda.

Incorporarse a un laboratorio y comenzar a trabajar en un proyecto nuevo parecería un trabajo difícil, sin embargo ese no fue mi caso porque conté con el apoyo de todas las personas que ahí se encontraban, por ello agradezco a la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco que resolvió muchísimas de mis dudas respecto al uso de colorantes, empleo de las técnicas e interpretación de imágenes; a la Doctora Clara Esquivel que resolvió oportunamente los problemas con el ultramicrotomo y a la Bióloga Amelia López Herrera,

que me enseñó a ser paciente frente al ultramicrotomo además de compartirme sus secretos para el manejo del mismo.

También agradezco a todos los compañeros del laboratorio que por su compañía, hicieron más llevaderas las largas horas de trabajo, ellos son Erick, Rebeca, Juanito, Paty, Axel, Aldebarán, Eli, Saúl, Magali y Gabriel.

Al Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias y a la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín, por su ayuda y paciencia en la revisión exhaustiva de las preparaciones para la obtención de las mejores micrografías para estudiar el desarrollo del polen.

De manera muy especial un agradecimiento a la M. en C. Karina Jiménez Durán responsable del microscopio confocal en el Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Química, por su apoyo en la revisión de preparaciones en el microscopio confocal e interpretación de las imágenes ahí obtenidas.

Quiero extenderme en este agradecimiento porque “Kari” o “La Miss” como con todo cariño y respeto en ocasiones me refería a ella estuvo brindándome TODO su apoyo, desde el momento de inicio de este trabajo hasta verlo concluido. Gracias, porque antes de ser una asesora fuiste mi amiga y bajo ese esquema supiste entenderme y apoyarme no sólo en el ámbito académico sino en el personal también, por ello hoy puedo decir ¡¡¡Lo Logramos!!!!

También quiero agradecer a todos los sinodales Ernesto, Guille, Sonia, Judith y Kary porque más allá de de aportar valioso comentarios para mejorar mi trabajo, todos ustedes reforzaron en mi ese gusto tan grande que tengo por la plantas.

El agradecimiento también es para aquellas personas que en esta última etapa de mi vida además de ayudarme a mantenerme saludable físicamente me han hecho crecer como persona y me refiero a todo el Marius Team (Equipo Representativo de Triatlón de la UNAM).

Por último agradezco a la Facultad de Ciencias y la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater.

DEDICATORIAS

Antes de comenzar en forma este apartado quiero compartir la siguiente cita:

“Nothing of me is original. I am the combined effort of everybody I've ever known”. Chuck Palahniuk, escritor estadounidense.

Comienzo así, porque esas palabras reflejan una de las ideas centrales que rigen mi forma de pensar, y es así que yo creo que todo lo que soy es la combinación de enseñanzas, experiencias, costumbres, etc. de todas, absolutamente todas las personas que he conocido, por ello en esta sección, me dedicaré a nombrar a la mayoría de ellas.

Entonces comienzo así, este trabajo está dedicado a:

Mi familia. Angelina, mi mamá, José, mi papá y Pepe, mi hermano.

Mis amigos de primaria y secundaria. Armando, Iván, Abraham, Luis Ángel, Gabriela, José Antonio, Sergio y Lola.

Mis amigos de preparatoria. Rubén, Alejandra, Edgar, Jonathan, Juan, Karen, Saira y Regina.

Mis amigos de la universidad. Helga, Angélica, Tania, Jimena, Rafael, Ulises, Carlos, Alex, Poncho, Jorge, Edith, Aratzení, Aura, Chucho, Los Amigos del Cuadro Generación 2006, Kin, Brenda y a todos los de generaciones diferentes a la mía.

Mis amigos del equipo de Triatlón. Mario, Juan, Liz, Bety, Paco, Rodrigo, David (Sincu y Octavio), Argelia, Argel, Aaron, Marisol, Víctor, Mauricio, Alina, Gonzalo, Oscar, Lez, Aldo, Lalo, Gerardo (manita y gruñón), Sinuhé, Norma, Romano, Violante, Marco, Mara, Wifer, Denis, Karen, Martín, Manfredo, Cristian y Manuel.

Mis amigos de otras partes. Ricardo, Arturo, David, Martín, Edgar, Linda, Libertad y Elizabeth.

Me gustaría extenderme y escribir algo más personalizado, sin embargo creo que cada uno de ustedes sabe bien lo que hemos compartido y lo mucho que los aprecio.

A mi pequeño Campeón (Rocko) y mi pequeña Princesa (Ivana), quienes sus pequeñas sonrisas y su cariño me han ofrecido la amistad más sincera. A ustedes por que sin proponérselo, me han enseñado que tengo que ser una mejor persona día con día y trabajar duro para que ustedes y las nuevas generaciones tengan un mejor futuro.

Por su puesto a todos mis maestros y muy especialmente a David Benavides Velázquez.

Por último, si me conoces y no ves tu nombre escrito, te pido tu disculpa, la razón es la mala memoria; porque como ya lo dije antes, si nos conocemos has dejado en mí algo que me hace ser el día de hoy la persona que soy. Gracias.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
Microsporogénesis en angiospermas	4
Microgametogénesis en angiospermas	5
Formación y crecimiento del tubo polínico	6
Unidad germinal masculina	8
Fecundación	9
Embriología de la familia Podostemaceae	10
Justificación	14
Objetivos	15
Metodología	15
Sitio de estudio	15
Descripción de la especie	16
Trabajo de campo	17
Trabajo de laboratorio	19
Resultados	22
Microsporogénesis y microgametogénesis	22
Germinación de los granos de polen y crecimiento del tubo polínico	32
Discusión	37
Desarrollo temprano del gineceo y androceo	37
Desarrollo de la pared de la antera	37
Comparación del desarrollo del gametofito masculino en distintas especies	40
Capas y tipo de desarrollo de la pared de la antera	40
Tapete	41

Microsporogénesis, citocinesis y tétradas	41
Esporangios de la antera	44
Núcleos en el polen maduro	45
Unidad de dispersión del polen y dehiscencia de la antera	45
Germinación de los granos de polen y crecimiento de los tubos polínicos	47
Autogamia	47
Geitonogamia y Xenogamia	48
Conclusiones	53
Bibliografía	55
Anexo	64

RESUMEN

La familia Podostemaceae es la más grande entre las angiospermas acuáticas. Son hierbas que crecen sumergidas en ríos de corrientes rápidas y cascadas, adheridas a rocas y uno de sus caracteres embriológicos más representativo es la ausencia de endospermo. Debido a los escasos estudios sobre el desarrollo del gametofito masculino y con el propósito de contribuir al esclarecimiento de la falta de endospermo, se realizó este estudio en *Marathrum schiedeanum* (Cham.) Tul. Se usaron botones florales y flores en anthesis para estudiar la microsporogénesis y microgametogénesis, ello con el propósito de descartar anomalías en la formación del gametofito; también se emplearon pistilos polinizados a distintos intervalos de tiempo, para observar el crecimiento del tubo polínico y sus núcleos. En botones florales la pared de la antera se conforma de epidermis, endotecio, una capa media y tapete. De la meiosis se forman tétradas tetraédricas, con citocinesis simultánea. En la etapa de microsporas, la pared de la antera se forma de epidermis, endotecio y el tapete en degeneración. Es posible hallar anteras con cinco microsporangios, en vez de cuatro, el microsporangio adicional se sitúa adyacente al haz vascular y contiene polen abortivo. La dehiscencia de la antera es introrsa y longitudinal. En la anthesis el grano de polen es tricolpado, bicelular y se libera en mónadas. En pistilos con cuatro horas post-polinización (HPP) se encontraron algunos tubos polínicos en el estigma, con la célula vegetativa y la generatriz. A las siete HPP se observó una mayor presencia de tubos polínicos, aún en el estigma. A las nueve HPP, se encontraron numerosos tubos polínicos alcanzando la base del estigma. A las 24 HPP se registró una germinación casi total de los granos de polen y los tubos polínicos llegaron a la zona de placentación. En *M. schiedeanum*, durante la anthesis el gametofito masculino se libera con un solo gameto y para saber si se forma un segundo gameto durante el crecimiento del tubo polínico, se requiere de un mayor número de ensayos en pistilos con tiempos de polinización superiores a 12 horas.

INTRODUCCIÓN

La familia Podostemaceae está ubicada en la clase Magnoliopsida. Esta familia es la más grande dentro de las angiospermas acuáticas, con aproximadamente 50 géneros y alrededor de 275 especies (Cook, 1990; Takhtajan, 1997).

Actualmente se reconocen tres subfamilias: Podostemoideae, que incluye a la mayoría de géneros y especies; Tristichoideae, con 3 géneros y alrededor de 8 especies y la subfamilia Weddellinoideae, que contiene al género monoespecífico *Weddellina* Tul. (Cook y Rutishauser, 2007).

Son plantas herbáceas que crecen en ríos de corrientes rápidas, adheridas comúnmente a sustratos rocosos; generalmente anuales, se desarrollan estando totalmente sumergidas o con algunas partes flotantes, pero la producción tanto de flores como de frutos ocurre cuando el nivel del agua desciende (Cronquist, 1981).

En la época de lluvias las podostemáceas alcanzan su mayor desarrollo vegetativo. Esta familia, comparada con otras plantas acuáticas, produce en un corto tiempo flores, frutos y semillas abundantes (Murguía-Sánchez, 2003).

La fase sexual de las podostemáceas presenta caracteres que destacan del resto de las angiospermas. Éstos caracteres se encuentran en el óvulo y son: un saco embrionario tetracelular monospórico (Jäger-Zürn, 1997) o bispórico (Arekal y Nagendran, 1975b en: Murguía-Sánchez, 2003), la transformación de la nucela en un plasmodio nucelar o pseudo saco embrionario y “la carencia de la doble fecundación”¹ y por tanto la ausencia del endospermo (Battaglia, 1980).

Johri *et al.* (1992) enumeran las características diagnósticas de la familia Podostemaceae:

1. Tapete tipo glandular con células binucleadas.
2. Los granos de polen se liberan en pares en algunas especies.
3. Óvulo anátropo, bitégmico y tenuinucelado.

¹ El autor menciona la carencia de “la doble fecundación”.

4. Formación de un pseudo-saco embrionario o plasmodio nucelar.
5. Se presentan tipos de saco embrionario Apinagia, Dicraea y Podostemum (bispóricos).
6. Ausencia del endospermo.
7. Embriogénesis tipo Solanado.
8. Desarrollo de un haustorio a partir de una célula binucleada del suspensor.
9. Semilla tégmica.

La ausencia del endospermo en esta familia ha dado pie a la formulación de varias hipótesis para explicarla; sin embargo en la actualidad aún no se conoce la respuesta.

Es probable que la ausencia de endospermo pueda deberse a que la célula generatriz nunca se divide, por lo tanto no se forman los dos gametos masculinos en el grano de polen ó que durante el avance del tubo polínico a través del estigma, una de las dos células espermáticas muera².

El propósito de esta investigación es averiguar si durante el desarrollo del grano de polen se forman las dos células espermáticas (gametos masculinos) necesarias para realizar la doble fecundación y si éstas persisten durante el desplazamiento del tubo polínico a través del estigma sésil hasta el saco embrionario en *Marathrum schiedeanum*.

ANTECEDENTES

La investigación embriológica en las angiospermas, que aborda virtualmente todos los eventos relevantes de la reproducción sexual (Tobe, 1989), ha demostrado que los caracteres que definen la monofilia de las angiospermas están directamente relacionados con la fase sexual de su ciclo de vida: estambres con dos pares de sacos polínicos, anteras con endotecio en posición hipodérmica, un microgametofito con tres núcleos,

² Acerca de dicha afirmación no existe una cita bibliográfica textual; sin embargo puede elaborarse una hipótesis como ésta, ya que, se ha observado la formación del embrión en la semilla y no así del endospermo.

estigma receptivo para la adherencia y la germinación del polen, carpelo o carpelos que encierran óvulos uni ó bitégmicos, megaspora carente de esporopolenina, megagametofito generalmente con ocho núcleos y la formación de un endospermo (Crane, 1985; Doyle y Donoghue, 1986; Crane *et al.*, 1995).

Microsporogénesis en angiospermas

La microsporogénesis es el proceso por el cual se forman las microsporas a partir de la división meiótica de las células madres del polen. Se lleva a cabo en el interior del microsporangio. Las células madres del polen (microsporocitos) derivan de las células del tejido esporógeno. Estas células, con un citoplasma denso y núcleos prominentes, entran en meiosis perdiendo las conexiones plasmodesmáticas con las células del tapete. Después, las paredes pectocelulósicas de los microsporocitos se hidrolizan y son remplazadas por nuevas paredes de calosa. Durante este proceso, los plasmodesmos entre los microsporocitos se interrumpen, pero se encuentran comunicados mediante hebras de citoplasma que corren a través de canales citomícticos de las paredes de calosa (Batygina, 2002).

Esto sugiere que en efecto los microsporocitos no están influenciados por los sistemas de la planta progenitora, por lo que el proceso meiótico se realiza y se controla por el genoma haploide (Dickinson, 1982).

La primera división meiótica conduce a la formación de una diada. Después de la segunda división meiótica, una tétrada de microsporas se dispone en un arreglo tetraédrico, siendo éste el más frecuente (Batygina, 2002).

Microgametogénesis en angiospermas

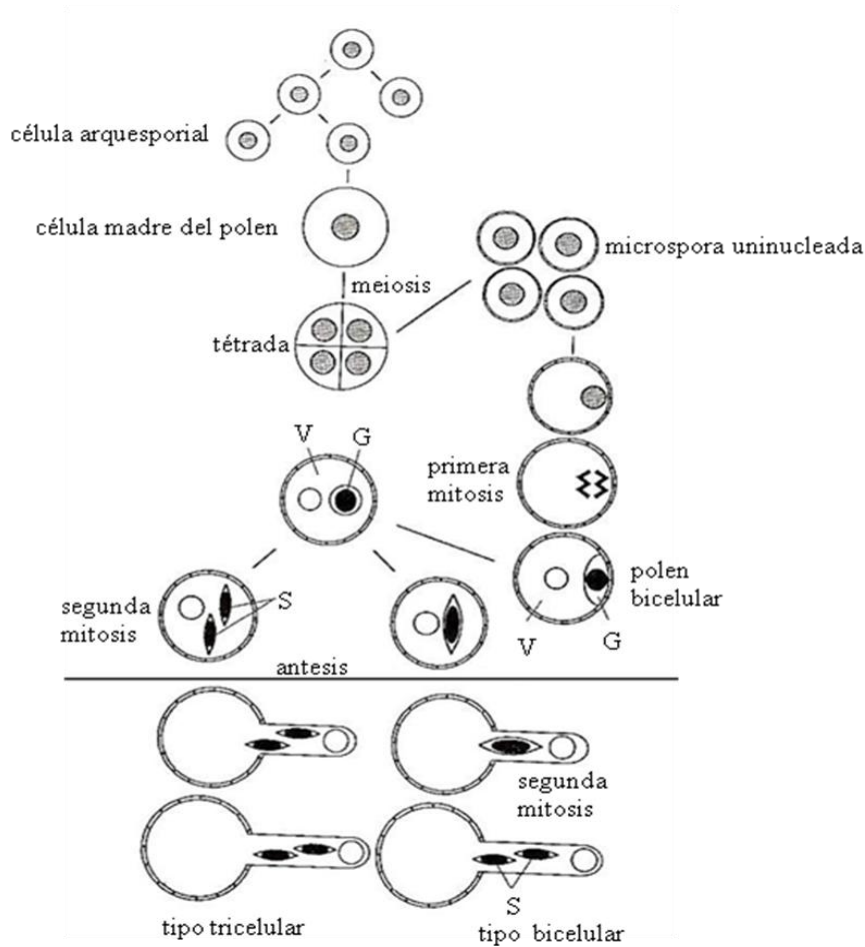
La calosa que aún rodea a las microsporas es degradada por la activación de la calasa (β 1-3 glucanasa), entonces son separadas de manera individual en el interior del lóculo de la antera. En este momento, las microsporas tienen un núcleo prominente al centro y organelos. La microspora continúa su crecimiento con los nutrientes disponibles en el lóculo de la antera, solo después de haberse degradado la pared de calosa y gracias a la flexibilidad que presenta la capa basal de exina (Shivanna, 2003).

La división mitótica es el mayor evento morfogénico después de la separación de la tétrada. Una gran vacuola se desarrolla al centro de la microspora, suceso acompañado con la migración del núcleo hacia la periferia (Shivanna, 2003).

Tanto el desarrollo de la vacuola como el citoesqueleto parecen estar involucrados en la migración del núcleo (Brown y Lemmon, 1991).

Después de la migración del núcleo hacia la periferia, una gran reorganización sucede en el citoplasma; la mayoría de los plastidios y mitocondrias se trasladan hacia la región del núcleo, resultando en una distribución polarizada de los organelos (Shivanna, 2003).

El núcleo de la microspora entra en división mitótica asimétrica, evento seguido de la formación de la placa celular entre los dos núcleos de las células hijas. Una pared celular se forma entre las membranas plasmáticas de los dos núcleos y se fusiona con la intina (pectocelulósica) por el margen. Esta división mitótica asimétrica de la microspora da como resultado la formación de una gran célula vegetativa, que recibe la mayoría de los plastidios y mitocondrias de la microspora, y una célula generatriz mucho más pequeña con ninguno o muy pocos organelos (Shivanna, 2003). Esquema 1.



Esquema 1. Microsporogénesis y microgametogénesis en angiospermas. G, célula generativa, S, célula espermática; V célula vegetativa. Modificado de Raghavan (1997).

Formación del tubo polínico y crecimiento

En la antesis, las anteras abren y el polen es transportado por diferentes vectores (insectos, viento, agua, etc.) y es depositado en la superficie del estigma (Konar y – Linskens, 1966). Después de la polinización, los granos de polen germinan sobre la superficie del estigma y los tubos polínicos crecen entre las células del estigma y el tejido de transmisión del estilo, hacia la ovocélula (Batygina, 2006).

El tubo polínico es una estructura especializada del gametofito masculino, que es responsable de transportar las células espermáticas al saco embrionario para efectuar la

doble fecundación. El tubo polínico se origina como un crecimiento externo tubiforme de la célula vegetativa del grano de polen (Batygina, 2006).

Una de las características más peculiares del tubo polínico es la presencia de las células espermáticas dentro de su protoplasto. Ambas células espermáticas están presentes cuando se trata de granos de polen tricelulares (Apocynaceae, Cyperaceae, Menyanthaceae, Poaceae, Valerianaceae). En plantas con granos de polen bicelulares, la célula generatriz comienza su división para formar las dos células espermáticas una vez que el tubo polínico está en crecimiento (Chloranthaceae, Fagaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Liliaceae). En el tubo polínico en crecimiento las células espermáticas se mueven hacia el ápice de éste (Batygina, 2006).

La germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos sucede en dos etapas. La primera de ellas comienza durante la hidratación del grano de polen. Durante la germinación, la intina cumple tres funciones: la capa exterior (pectinas) regula la ruptura de las aperturas, la capa media (celulosa) participa en el transporte de proteínas a la superficie del estigma durante la hidratación del grano de polen; la capa interna (glucanos y pectinas) es la precursora de la pared celular del tubo polínico (Heslop-Harrison, 1979b).

Durante la segunda etapa de crecimiento (interacción del tubo polínico y el estigma) sucede la recepción o el rechazo del tubo polínico. Las proteínas, incluyendo diferentes enzimas, juegan un rol esencial en este proceso (Heslop-Harrison, 1979a). Dichas proteínas pueden tener distinto origen: esporofítico (provienen del tapete) y se encuentran en la exina o gametofítico (de las microsporas o de los granos de polen) y están en la intina (Batygina, 2006).

El crecimiento del tubo polínico sobre un estigma compatible y el tejido de transmisión, está estrictamente orientado a través de un canal conspicuo que contiene exudados que rodean a las células y que proveen del medio para el crecimiento de los tubos polínicos o

a través de espacios intercelulares de filas de células firmemente compactadas y elongadas (donde los tubos polínicos entran en contacto con productos de la secreción del estilo). Los tubos polínicos en el ovario se mueven a través de filas de células secretoras localizadas en su pared interna o por la placenta. En algunas especies la tasa de crecimiento del tubo polínico alcanza 1.5 μ m por segundo (Shivanna *et al.*, 1978).

La elongación de los tubos polínicos ocurre en su ápice por la fusión de vesículas con la membrana plasmática. Las vesículas secretoras del aparato de Golgi son transferidas al ápice por una especie de fuente citoplasmática mediada por el citoesqueleto. Un mecanismo específico regula la constante síntesis, degradación y reorganización de los elementos del citoesqueleto para mantener la distribución de las vesículas hacia el ápice del tubo polínico para su elongación (Derksen *et al.*, 1995).

La zona subapical del tubo polínico contiene vesículas secretoras y varios organelos (mitocondrias, aparato de Golgi, RE) y la zona nuclear, el núcleo de la célula vegetativa y las células espermáticas. La zona de vacuolización y de formación de los tapones de calosa, presenta separaciones de las secciones proximales del tubo polínico. Lo anterior provee de un alto potencial metabólico en las tres primeras zonas. En la región apical del tubo polínico se lleva a cabo la máxima síntesis de nuevos materiales para la construcción de la pared celular (Heslop-Harrison, 1979a).

El volumen y la localización de la célula vegetativa y las células espermáticas o la célula generatriz durante el crecimiento del tubo polínico y los cortes periódicos por tapones de calosa están en constante cambio (Batygina, 2006).

Unidad germinal masculina

Es la unidad funcional de transmisión de la reproducción sexual en las plantas con flores formada por las células espermáticas o su precursora, la célula generatriz, en asociación física con el núcleo de la célula vegetativa. La unidad germinal masculina (UGM) contiene

todo el DNA hereditario del linaje reproductor masculino, incluyendo el del núcleo de la célula vegetativa y de las células espermáticas (Dumas *et al.*, 1984).

Dos diferentes clases de asociación son evidentes en la UGM: la primera es la asociación entre el núcleo vegetativo y la célula generatriz (evidente en polen bicelular) y una de las dos células espermáticas (evidente en polen tricelular y tardíamente en polen bicelular cuando el tubo polínico crece); la segunda asociación es entre ambas células espermáticas, iniciada por la división de la célula generatriz, con frecuencia presente todo el tiempo durante el descenso del tubo polínico (Batygina, 2006).

Fecundación

Después de arribar al ovario, el tubo polínico puede entrar al óvulo, ya sea a través del micrópilo o por otra ruta. La primera es la condición usual y es conocida como porogamia. En algunas plantas el tubo polínico entra al óvulo a través de la calaza. Dicha condición es conocida como calazogamia. Una estructura de especial significado para facilitar la entrada del tubo polínico al óvulo es conocida como obturador, formación de origen placentario, funicular o tegumentario, en conexión con el tejido de transmisión que orienta y dirige el tubo polínico hacia el micrópilo. (Maheshwari, 1950).

Posteriormente de haber penetrado la pared del saco embrionario, el tubo polínico puede pasar tanto entre la ovocélula y una sinérgida como entre la pared del saco embrionario y una sinérgida o a través de una sinérgida. Como regla solo una de las sinérgidas es destruida por el impacto del tubo polínico y la otra permanece intacta hasta un tiempo después (Maheshwari, 1950).

Se ha observado que los tubos polínicos quedan colocados entre la ovocélula y los núcleos polares (Maheshwari, 1950).

Después que el tubo polínico ha descargado su contenido en el saco embrionario, uno de los núcleos de las células espermáticas se fusiona con la ovocélula (singamia) y el otro núcleo con los núcleos polares (triple fusión) de la célula central. Como resultado de esta doble fecundación, se forman un embrión diploide y típicamente un endospermo triploide. (Maheshwari, 1950).

Embriología de la familia Podostemaceae

El estudio de las Podostemáceas comenzó hacia finales del siglo XVIII, cuando en 1775 *Mourera fluviatilis* fue descubierta y descrita por Aublet en 1803 Michaux estableció el género tipo *Podostemum*, considerando la especie *P. ceratophyllum* (Mohan Ram y Sehgal, 2001) y hacia 1815 fue reconocida la familia Podostemaceae por Richard (Les *et al.*, 1997).

El crecimiento vegetativo de las Podostemáceas ocurre a distintas profundidades (75–100 cm) en ríos con cascadas y corrientes rápidas, con intervalos de temperatura de 14 a 27°C (Sculthorpe, 1967); pero se les encuentra usualmente en lugares soleados con agua bien aireada (Philbrick y Novelo, 1995). La antesis, en contraparte sucede en el medio aéreo, sólo cuando baja el nivel del agua en la época seca del año. En esta parte del ciclo de vida, es posible que el incremento de la temperatura, el decremento del volumen de agua y los nutrientes disponibles en el agua sean los factores que disparan la diferenciación del meristemo vegetativo a meristemo floral (Sculthorpe, 1967; Sehgal *et al.*, 1993) y tal vez también el alargamiento de los pedicelos (Schnell, 1967).

Se propone que las flores de las Podostemáceas exhiben anemofilia o entomofilia, aunque también ocurre autogamia o cleistogamia (Jäger-Zürm, 1999). Los frutos se desarrollan fuera del agua cuando la planta madre ya se ha secado (Philbrick y Novelo, 1994) al igual que la maduración de la semilla (Magnus, 1913 en: Murguía-Sánchez, 2003).

La fase gametofítica del ciclo de vida de las Podostemáceas inicia cuando el cuerpo vegetativo se encuentra aún sumergido, ya que las flores se forman dentro del tallo (Schnell, 1967); la floración ocurre al final de la época de lluvias (Philbrick y Novelo, 1995).

Warming (1882 en: Jäger-Zürn, 1997) inició el estudio de la embriología en Podostemáceas de la India principalmente. En la primera década del siglo XX se estableció que en el óvulo se localizan los caracteres embriológicos que definen a la familia Podostemaceae y en taxa asiáticos se continuaron las investigaciones.

Durante el desarrollo del óvulo, se observó también que se forma un “pseudo-saco embrionario” (Went, 1908) a causa de la degradación de las paredes celulares de la nucela (Magnus, 1913) y se le consideró como un reservorio ideal de agua (Arber, 1920). Arekal y Nagendran (1975) usan el término “plasmodio nucelar”, para precisar que esta estructura tiene su origen en la nucela. Así, el plasmodio nucelar aparentemente substituye la función del endospermo (Palser, 1975) ya que, se encarga de nutrir al saco embrionario y posteriormente al embrión (Magnus, 1913; Razi, 1949, 1955; Mukkada, 1964, 1969; Nagendran *et al.*, 1977), lo que se infiere por la presencia de núcleos conspicuos que sugieren una activa función de síntesis (Arekal y Nagendran, 1975).

Respecto al estudio embriológico del gametofito masculino en la familia Podostemaceae, se presentan en una tabla los resultados de los estudios realizados en algunas de sus especies (tabla 1).

Tabla 1. Caracteres embriológicos del gametofito masculino en podostemáceas.

	# Capas pared antera inmadura	Tipo de desarrollo de la pared	Tipo de tapete	Tipo de citocinesis	Tipo de tétradas	# Esporangios de la antera	Polen liberado	Tipo de diseminación del polen	Tipo de dehiscencia
Podostemoideae	<i>Apinagia latifolia</i> ¹	3		secretor	sucesiva	isobilaterales o decusadas	4	bicelular	mónadas
	<i>Diamantina lombardi</i> ²				simultánea	tetraédricas			tétradas
	<i>Marathrum rubrum</i> ³	2,3,4	mono o dicotiledóneo	secretor	simultánea	tetraédricas	4	bicelular	mónadas introrsa
	<i>Vanroyenella plumosa</i> ⁴	5-6	Básico	secretor	simultánea	tetraédricas	4	bicelular	mónadas introrsa
	<i>Oserya coulteriana</i> ⁵		no observado	secretor	no observado	no observado	4	bicelular	mónadas introrsa
	<i>Podostemum ricciiforme</i> ⁶		no observado	Secretor	sucesiva	isobilaterales	4	bicelular	diadas introrsa
	<i>Podostemum subulatum</i> ⁷				sucesiva			bicelular	diadas
	<i>Podostemum olivaceum</i> ⁸				sucesiva			bicelular	diadas
	<i>Polypleurum stylosum</i> ⁹	5	básico		sucesiva			bicelular	diadas
	<i>Thelethylax minutiflorus</i> ¹⁰				simultánea				
	<i>Terniola zeylanica</i> ¹¹	4	mono o dicotiledóneo	secretor	simultánea			bicelular	diadas
<i>Griffithella hookeriana</i> ¹²	4	mono o dicotiledóneo	secretor	sucesiva			bicelular	diadas	
Tristichoidae	<i>Tristicha trifaria</i> ¹³	4	dicotiledóneo	secretor	no observado	no observado	4	bicelular	mónadas introrsa
	<i>Indotristicha ramosissima</i> ¹⁴	4	monocotiledóneo		simultánea		4	tricelular	mónadas introrsa
	<i>Dalzellia ceylanica</i> ¹⁵				simultánea				mónadas
Weddellinoideae	<i>Weddellina squamulosa</i> ¹⁶	4-5	básico o mono o dicotiledóneo	secretor	desconocido	desconocido		bicelular	mónadas

1. Jäger-Zürn *et al.*, (2005); 2. Philbrick *et al.*, (2004) en Jäger-Zürn *et al.*, 2005; 3. Jäger-Zürn *et al.*, (2005) y Murguía-Sánchez, (2003); 4. Murguía-Sánchez *et al.*, (2001) y Murguía-Sánchez, (2003); 5. Murguía-Sánchez, (2003); 6. Murguía-Sánchez, (2003); 7. Magnus y Werner 1913 en Jäger-Zürn *et al.*, 2005 y Magnus, (1913) en Murguía-Sánchez, 2003; 8. Magnus y Werner 1913 en Jäger-Zürn *et al.*, 2005 y Magnus, (1913) en Murguía-Sánchez, 2003; 9. Magnus y Werner 1913 en Jäger-Zürn *et al.*, 2005; Khosla *et al.*, (2000) y Kapil (1970) en Murguía-Sánchez, 2003; 10. Jäger-Zürn, (1967) en Jäger-Zürn *et al.*, (2005); 11. Mukkada, (1969) en Murguía-Sánchez, 2003; 12. Razi, (1949) en Jäger-Zürn *et al.*, 2005; 13. Murguía-Sánchez, (2003); 14. Khosla y Sehgal, (2009), Chopra y Mukkada, (1966) en Jäger-Zürn *et al.* 2005; 15. Mukkada, (1969) en Murguía-Sánchez, 2003; 16. Jäger-Zürn (1997).

Un tema mucho menos estudiado corresponde a la germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos, por ejemplo, Khosla *et al.* (2000) refieren que en *Polypleurum stylosum* (Podostemoideae) la germinación abundante del polen ocurre dentro de las seis horas posteriores a la polinización, en este intervalo los tubos polínicos se limitan a los estigmas; después de 12 a 14 horas entran en el ovario y se observan en la placenta 18 a 20 horas después de la polinización, momento en que los tubos polínicos lograron entrar en pocos óvulos. La fecundación no fue observada y no se formó endospermo. En *Indotristicha ramosissima* (Tristichoideae) (Khosla y Sehgal, 2009), se encontró que la germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos suceden mediante la autopolinización y la polinización cruzada (manuales) y natural; sin embargo la mayor germinación de granos de polen (95%) ocurrió en la flores polinizadas naturalmente y en las autopolinizadas de manera manual. Los tubos polínicos alcanzaron la base del estigma entre las 4 y 5 horas, el extremo del ovario entre las 8 y 10 horas y entraron a los óvulos entre 16 a 20 horas posteriores a la polinización tanto en polinizaciones naturales como manuales.

Por otra parte Luna-Ramos (2006) reporta crecimiento de tubos polínicos tanto en flores autopolinizadas como provenientes de polinizaciones cruzadas de *Marathrum rubrum* y *Marathrum schiedeanum*.

Respecto a la falta de la doble fecundación y la ausencia de endospermo en la familia Podostemaceae, existen algunos reportes, como el de Battaglia (1980), quien afirma que dichas características son inusuales para plantas con flores; el de Sehgal *et al.* (2010) y el de Sa'í-Haiad *et al.* (2010), quienes corroboran dicha información.

JUSTIFICACIÓN

La doble fecundación ha sido un proceso muy discutido en la familia Podostemaceae. La ausencia del endospermo ha llevado a la postulación de algunas hipótesis para explicarla. Si dichas hipótesis son planteadas en función del gametofito masculino, las posibles explicaciones podrían ser:

- a) El desarrollo del grano de polen es anormal y por lo tanto éstos son abortivos.
- b) Que el tubo polínico al llegar al saco embrionario porte una unidad germinal masculina integrada solamente por los núcleos de la célula vegetativa y de la célula generatriz; de esta manera, solo habría un núcleo capaz de fecundar a la ovocélula y no se podría completar el proceso de la triple fusión entre los núcleos polares de la célula central y un segundo núcleo espermático.
- c) La división de la célula generatriz puede suceder durante el crecimiento del tubo polínico hacia el óvulo; por lo que se formaría una unidad germinal masculina típica integrada por el núcleo de la célula vegetativa y dos células espermáticas. Sin embargo, antes de completarse el proceso de la doble fecundación, uno de los dos núcleos espermáticos podría degenerar completándose únicamente la singamia, responsable de la formación del embrión.
- d) La división de la célula generatriz puede suceder durante el crecimiento del tubo polínico y la unidad germinal masculina se conformaría de manera habitual. Sin embargo aún habiendo llegado al interior del saco ambos núcleos espermáticos, sólo conseguiría fusionarse uno de ellos, el responsable de la formación del embrión.

Para tratar de probar estas hipótesis se estudiará la microsporogénesis, la microgametogénesis y el desarrollo del tubo polínico en *Marathrum schiedeanum*.

OBJETIVO GENERAL

- Conocer el desarrollo y estructura del grano de polen y del tubo polínico en *Marathrum schiedeanum*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la microsporogénesis en *Marathrum schiedeanum*.
- Conocer la microgametogénesis en *Marathrum schiedeanum*.
- Determinar el número de células que transporta el tubo polínico en el pistilo.

METODOLOGÍA

Sitio de estudio

El material colectado para el presente estudio proviene de dos localidades ubicadas en el Estado de Jalisco, México. La primera de ellas se encuentra en el Municipio de El Tuito, a un kilómetro río arriba sobre el río Los Veranos, este río llega a la localidad conocida como Chico's Paradise, aproximadamente 25km al sur de Puerto Vallarta (20° 26' 05"N, 105° 18' 10" O).

La segunda localidad se encuentra en el río Las Juntas, 50km al sur de Puerto Vallarta, cerca del puente Las Juntas del Sur, a una altitud de 300 msnm, en el municipio de El Tuito (20° 29' 00"N, 105° 17' 35" O).

En ambas localidades las condiciones donde se desarrollan las plantas son prácticamente las mismas. Se trata de ríos de corriente rápida, donde las rocas sobre las cuales se lleva a cabo el ciclo de vida de las plantas se encuentran en zonas totalmente expuestas a la radiación solar. En dichas rocas el cuerpo vegetativo de las plantas se encuentra firmemente adherido.

Descripción de la especie

Marathrum schiedeanum es una planta anual o perenne; el tallo llega a medir hasta 20cm de largo, algunas veces se encuentra ramificado, postrado o aplanado, con hasta 2.5cm de diámetro; las hojas son verdes, pero frecuentemente se puede observar un color rojizo en la superficie abaxial; miden hasta 80cm 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 2 a 4mm de largo y de 0.18 a 0.6mm de ancho; el ápice es agudo. Los pedicelos van de 4 a 10cm de largo con un ápice expandido en forma de copa alrededor de la base de la cápsula; este ápice va de 1.3 a 3mm de diámetro, con un borde que puede ser liso o irregularmente dentado. La flor presenta de seis a diez tépalos, que van de 0.4 a 1mm 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 6.5mm de largo; las anteras, de 1.4 a 2.8mm de largo; los estigmas, de 0.1 a 1.5mm de largo; los frutos son cápsulas de 4 a 6mm de largo y de 1.7 a 2.5mm de diámetro. Cada valva presenta tres costillas; la media de semillas por cápsula es de 392 (SD 279, n=76).

Marathrum schiedeanum tiene una amplia distribución en las zonas bajas de México (por debajo de los 1000 msnm); de Nayarit a Chiapas en la costa del Pacífico y en Veracruz en la costa del Atlántico. Se distribuye también en Guatemala, Belice y Costa Rica (Philbrick y Novelo, 1997a).

Existe entre *Marathrum schiedeanum* y *Marathrum rubrum* un gran parecido morfológico por ello comprobar la identidad taxonómica de la especie resulta importante. Se realizó en campo la distinción e identificación de la plantas, misma que se ve reforzada con la evidencia embriológica, encontrándose las siguientes diferencias significativas entre ambas especies.

A nivel morfológico, *M. rubrum* tiene hojas de color rojo brillante en ambas superficies adaxial y abaxial y la última división de la hoja de 0,02 a 0,06 mm de ancho, mientras que *M. schiedeanum* tiene hojas generalmente de color verde a rojizo en la superficie abaxial únicamente y última división de la hoja (0,08) 0,18-0,06 (1) mm de ancho. Mientras tanto, a nivel embriológico se reportan para *M. rubrum* un número variable de 2, 3 o hasta 4 capas de la pared de la antera, (epidermis, uno o dos estratos de endotecio y una capa media sin considerar el tapete) y para *M. schiedeanum* se observan 4 capas (epidermis, endotecio, capa media y tapete). Además existe entre ambas especies diferencias significativas en el tiempo de degradación de las capas medias y el tapete, ello comparándolas en etapas de desarrollo similares.

Un estudio de los cariotipos realizado en las especies mexicanas del género *Marathrum* por Oropeza *et al.* (1998) respalda la distinción de ambas especies.

Trabajo de campo

Recolección de botones florales

Del 29 de noviembre al 6 de diciembre de 2008, durante la época de secas, se recolectaron diferentes etapas del desarrollo floral (desde primordios florales, hasta flores en anthesis) en los ríos Horcones y Las Juntas, en el Estado de Jalisco, México. Las plantas colectadas provienen de rocas distintas y se extrajeron manualmente cuidando la integridad del tallo taloide por ser el órgano vegetal donde se desarrollan los botones florales. A continuación se realizó la extracción también manual de botones florales de los tallos taloides con el propósito de estudiar el desarrollo del gametofito masculino, particularmente las etapas de microesporogénesis y microgametogénesis.

En seguida el material fue fijado en una mezcla de glutaraldehído 3% y paraformaldehído 1.5%, manteniéndose a 4°C durante 6 días. Posteriormente se realizaron 6 lavados de 15

minutos cada uno con amortiguador de s-collidina (0.1 mol/L, pH 7.2), permaneciendo en dicha solución hasta su procesamiento en el laboratorio.

Polinizaciones artificiales (Germinación in vivo)

Se realizaron polinizaciones artificiales con la finalidad de observar el crecimiento del tubo polínico a través del estigma y placenta hasta su llegada al saco embrionario. Para ello fue necesario emasculiar los botones florales en preantesis con un día de anticipación a las polinizaciones; enseguida fueron cubiertas con pequeñas bolsas hechas con membrana de diálisis (Spectra de 32mm), para evitar la llegada de polen no deseado. Al día siguiente las flores emasculadas fueron descubiertas y polinizadas manualmente, con polen proveniente de flores distintas del mismo individuo (geitonogamia) y con polen de flores de otros individuos (xenogamia); realizando las colectas cada 15 minutos durante las 2 primeras horas y cada hora a partir de la tercera hora hasta la séptima hora post-polinización. Las flores colectadas fueron fijadas en formaldehído al 4% en PBS 1X a 4°C durante 24 horas, a continuación se realizaron 2 lavados de 15 minutos cada uno con amortiguador de PBS 1X, manteniéndose en dicha solución hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio.

Fue realizada una segunda colecta de material para realizar nuevas polinizaciones artificiales; mismas que se llevaron a cabo el día 8 de diciembre de 2009. La metodología utilizada esta ocasión fue distinta de la primera colecta. Fueron seleccionados y desprendidos de las rocas tallos taloides con flores en etapa de pre antesis; se mantuvieron en recipientes plásticos con un poco de agua del río durante todo el tiempo del experimento, desde que llegaron a la etapa de antesis, hasta el momento de ser colectadas dependiendo del tiempo establecido para cada una de las polinizaciones. El tipo de polinización artificial fue autopolinización, por lo que no fue necesario emasculiar con anticipación, como tampoco cubrir los estigmas de las flores dado que todas las flores

seleccionadas estaban en etapa de pre antesis. Los tiempos de colecta post polinización fueron de 2, 5, 7, 9 y 24 horas.

El material fue colectado y fijado en una mezcla 3:1 de alcohol etílico y ácido acético glacial por 24 horas.

Trabajo de laboratorio

Procesamiento de los botones florales

Se realizó la determinación de las distintas etapas de desarrollo de los botones florales (obedeciendo principalmente a criterios propios, de tipo morfométricos) colectados y fijados en campo (tabla 2).

Tabla 2. Determinación de las distintas etapas de desarrollo de los botones florales.

Etapa	Característica
1	2mm
2	3-4mm
3	5mm
4	6mm
5	7mm
6	9mm
7	10mm
8	11mm
9	12mm
10	19mm
11	Preantesis
12	Antesis

	Dentro del tallo
	Fuera del tallo con espátula
	Sin espátula

Una vez establecidas las distintas etapas de desarrollo, los botones y flores fueron deshidratados en una serie gradual de alcohol etílico: 30, 50, 75, 80, 96 y 100% (dos veces más en ésta última concentración), permaneciendo 20 minutos en cada una de las concentraciones e incluidos en LR – White, de acuerdo a lo descrito por López *et al.*

(2005). Los bloques del material incluido fueron cortados en un ultramicrotomo RMC MT990, empleando cuchillas de vidrio, obteniéndose cortes de 1 - 2 μ m de espesor que fueron teñidos con azul de toluidina de acuerdo a lo descrito por López *et al.* (2005).

Las preparaciones obtenidas fueron utilizadas para describir por medio de microscopía de luz, el desarrollo del grano de polen. Se obtuvieron a partir de ellas microfotografías en dos microscopios, Olympus Provis AX70 y Olympus BX51 para ilustrar dicho proceso.

Observación de tubos polínicos

Para cubrir este objetivo, las flores polinizadas y fijadas en formaldehído al 4%, fueron deshidratadas en una serie gradual de alcohol etílico: 30, 50, 75, 80, 96, 100, 100 y 100%, permaneciendo 20 minutos en cada una de las concentraciones e incluidas en LR – White, de acuerdo a lo descrito por López *et al.* (2005); para obtener cortes de 2.5 - 3 μ m de espesor en un ultramicrotomo RMC MT990, empleando cuchillas de vidrio. Fueron teñidos con azul de anilina y observados bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus BX51), para registrar la presencia de tubos polínicos. Posteriormente se realizó una inmunolocalización en aquellas preparaciones que mostraron gran cantidad de tubos polínicos utilizando la siguiente metodología:

- 1) Los cortes de entre dos y tres micras provenientes de inclusión en LR-White son puestos en portaobjetos cubiertos con una capa de poli-lisina (BIOCARE MEDICAL), donde se les coloca PBS 1X por 15 minutos.
- 2) Las preparaciones son secadas con papel filtro y se marca el contorno del portaobjetos con un plumón PAN-PEN.
- 3) Se colocan las preparaciones en una cámara húmeda y se aplica 100 μ L de solución de bloqueo (10% BSA en PBS 1X) por cada preparación, se incuban durante una hora a 20°C.

- 4) Se retira la solución de bloqueo y se coloca 200 μ L del anticuerpo primario 1-3 β glucano (Biosupplies, Australia) a una dilución 1:1000, se deja incubar toda la noche a 4°C.
- 5) A continuación se efectúan cuatro lavados de 5 minutos con PBS 1X.
- 6) Posteriormente se agrega a las preparaciones el anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 goat- mouse IgG (H+L) (INVITROGEN) en una dilución 1:200 y se incubar durante 4 horas a temperatura ambiente en oscuridad.
- 7) Nuevamente se efectúan cuatro lavados de 5 minutos con PBS 1X.
- 8) Se coloca sobre las preparaciones el medio de montaje (SIGMA); con DAPI (Roche) 100ng/mL en proporción 10:1 y se mantienen en refrigeración y oscuridad hasta el momento de su observación en el microscopio confocal Olympus FV 1000 donde se obtienen las microfotografías correspondientes.

Las flores que fueron fijadas en una mezcla 3:1 de alcohol etílico y ácido acético glacial, fueron observadas al microscopio confocal Olympus FV 1000 por medio de un aplastado (squash) y teñidas con azul de anilina con el propósito de determinar el grado de crecimiento del tubo polínico, apegándose a la siguiente metodología:

- 1) Las flores colectadas se fijaron por 48 horas con ácido acético, alcohol 3:1 y se dejaron un día como mínimo en la solución a temperatura ambiente.
- 2) Los pistilos se aclararon y suavizaron con sulfito de sodio 10% p/v y se colocaron en autoclave por cinco minutos.
- 3) Los pistilos aclarados y suavizados se cambiaron a solución de azul de anilina y se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante al menos un día.
- 4) Posteriormente los pistilos teñidos se aplastaron con la finalidad de disgregar el tejido, se observaron al microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 y se tomaron las microfotografías correspondientes.

RESULTADOS

Tanto la diferenciación del meristemo vegetativo en meristemo floral como el desarrollo de las estructuras de reproducción sexual de *Marathrum schiedeanum* comienzan en el interior del tallo taloide de la planta, cuando éste se encuentra aún sumergido, sin embargo la floración no comienza sino hasta la temporada de secas, cuando el nivel del agua descende y permite que la polinización ocurra en el medio aéreo.

La flor en anthesis de *Marathrum schiedeanum* que crece en las zonas de colecta, tiene un pedicelo que mide entre 5 y 6 cm de longitud. El androceo está conformado por 5 a 7 estambres, el pistilo se encuentra reducido a un ovario súpero (5mm de longitud en promedio) y un estigma bifido. El único verticilo vegetativo se encuentra representado por una serie de tépalos alternados con los estambres (figura 1).



Figura 1. Flores de *Marathrum schiedeanum*.

Microsporogénesis y microgametogénesis

Los botones florales que se encuentran completamente inmersos en el cuerpo vegetativo de la planta, cuando tienen un longitud de alrededor de 2mm presentan el androceo en un estado de desarrollo avanzado; formado por un número variable de 5 a 7 estambres, compuestos por un filamento y una antera biteca y tetrasporangiada (figura 2).

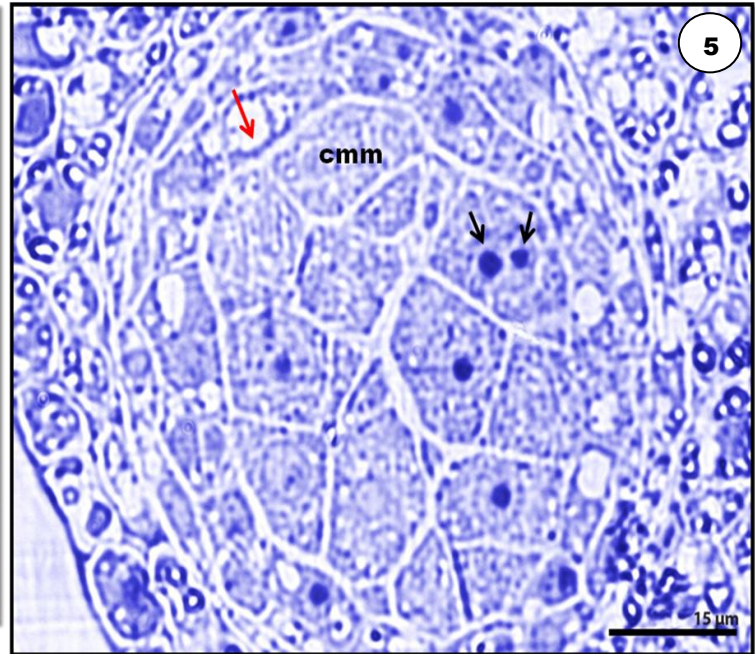
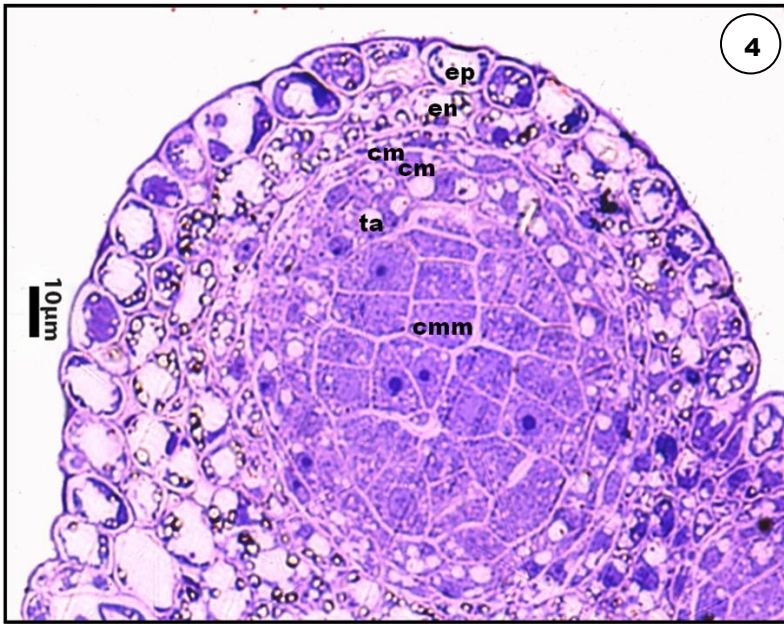
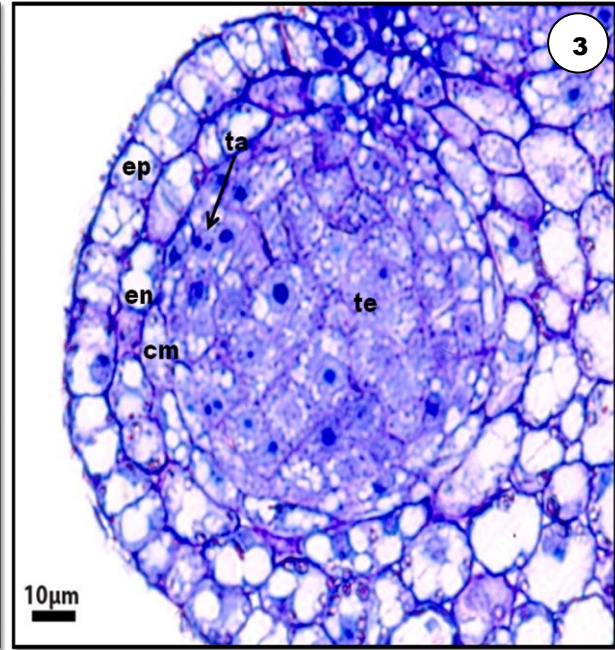
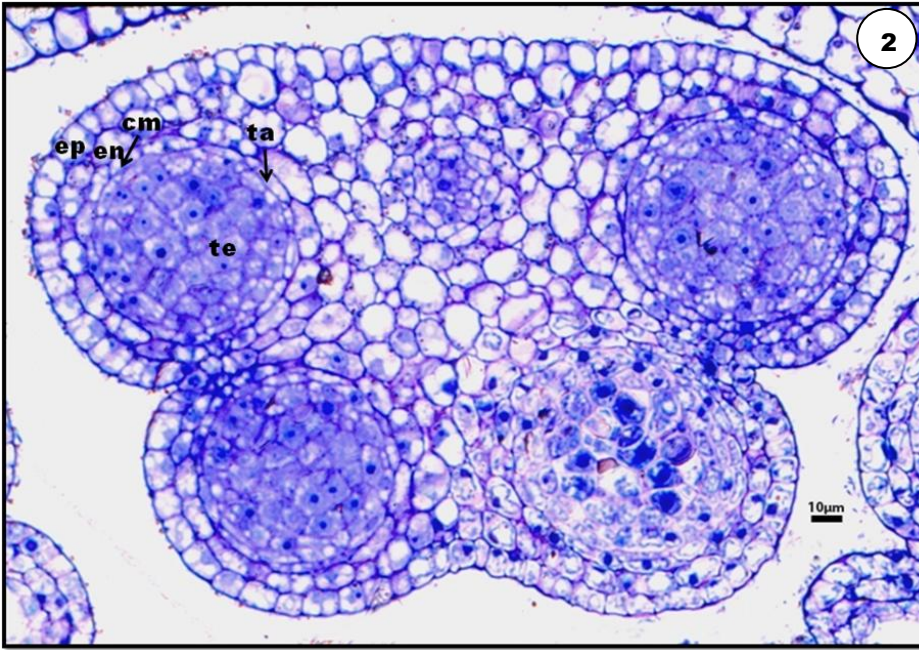


LÁMINA I

Capas de la antera joven y transformación del tejido esporógeno en células madre de las microsporas.

Figura 2. Sección transversal de la antera joven, se observa bitecada y tetrasporangiada.

Figura 3. Microsporangio que muestran las cuatro capas que conforman la pared de la antera. También se observa el tejido esporógeno.

Figura 4. En la pared de la antera se aprecia una segunda capa media y la transformación del tejido esporógeno en células madres de las microsporas.

Figura 5. Células madre de las microsporas, nucléolos (flechas negras), almidón (flecha roja).

Capa media (cm), célula madre de la microspora (cmm), endoteco (en), epidermis (ep), tapete (ta), tejido esporógeno (te), almidón (flecha en rojo).

En este estadio de desarrollo, la pared de la antera está conformada por cuatro capas: un estrato celular epidérmico, cuyas células son de cúbicas a rectangulares, y mucho más grandes que las del resto de la capas; el endotecio es monoestratificado, con células más alargadas en comparación con las de la epidermis; una capa media, con células alargadas pero más delgadas que las del endotecio; el tapete, uniestratificado cuyas células en este momento son rectangulares, alargadas y adelgazadas, al interior de las cuales es posible observar un núcleo y hasta dos nucléolos; finalmente rodeado por ésta última capa, el tejido esporógeno, integrado por un cúmulo de células de gran tamaño y núcleos conspicuos (figura 3).

La pared de la antera se encuentra completamente formada en la etapa en la cual se presenta tejido esporógeno. En una etapa posterior del desarrollo; donde los botones florales aún se encuentran dentro del cuerpo taloide de la planta y presentan una longitud de 3 a 4mm aproximadamente, es posible hallar una segunda capa media, situándose ambas entre el endotecio y el tapete (figura 4). Esta segunda capa media se forma posterior a la etapa de morfogénesis del resto de las capas de la pared de la antera y su origen se debe a una división periclinal de la capa media preexistente.

Comienza la síntesis y acumulación de pequeñas moléculas de almidón en epidermis, endotecio y capas medias. El tejido esporógeno se ha transformado en células madre de las microsporas; algunas de las cuales muestran en el interior de la membrana nuclear dos nucléolos y se observan aún en división mitótica (figura 5).

En botones florales de aproximadamente 5mm de longitud y aún dentro del tallo, las células madre de las microsporas de cada uno de los lóculos de la antera se conjuntan en el centro de los mismos, recubriéndose con una capa de calosa, aislándose del tapete (figura 6). Dicho fenómeno involucra la ruptura de los puentes citoplasmáticos que existían entre el tapete y las células madre de las microsporas, quedando así, conexiones

sólo entre tejidos del mismo tipo. En este momento la pared de la antera muestra la epidermis, el endotecio con células de un mayor tamaño, la capa media adyacente al tapete con cierto grado de degradación y el tapete, de tipo secretor, constituido de células que han alcanzado su máximo tamaño y cuya densidad citoplasmática indica que se encuentran en una etapa de gran actividad biológica (figura 7).

El tipo de citocinesis que se observa durante la microsporogénesis es simultánea, por ello, al finalizar la meiosis dos, se observan tétradas de microsporas tetraédricas, cubiertas por calosa (figura 8). El almidón sintetizado en etapas previas es significativamente menor. La pared de la antera en esta etapa se integra de epidermis, endotecio, la capa media adyacente al endotecio en degeneración, y el tapete, cuyas células aún son de gran tamaño y su citoplasma denso (figura 9). La meiosis se observó como un proceso asincrónico tanto en el interior de un mismo lóculo, en lóculos distintos de la misma antera como en anteras distintas, ya que al mismo tiempo se observaron tétradas bien formadas, diadas de microsporas, como microsporocitos únicamente cubiertos con calosa (figuras 10 y 11).

En etapas postmeióticas, en botones florales de entre 6 y 7mm de longitud (inmersos aún en el cuerpo vegetativo de la planta), la capa de calosa que agrupaba a la tétrada de microsporas ha sido ya disuelta, por ello es posible observarlas libres en los lóculos de la antera. La pared de la antera en esta etapa está constituida por la epidermis, el endotecio que persiste con células de mucho mayor tamaño que en etapas anteriores, los restos de las capas medias que ya se han degradado y el tapete, cuya apariencia indica una reducción considerable de su actividad y su próxima desaparición. El almidón en esta etapa, ya se ha utilizado por completo (figura 12).

Las microsporas presentan un gran núcleo en posición central y un citoplasma denso (figura 13).

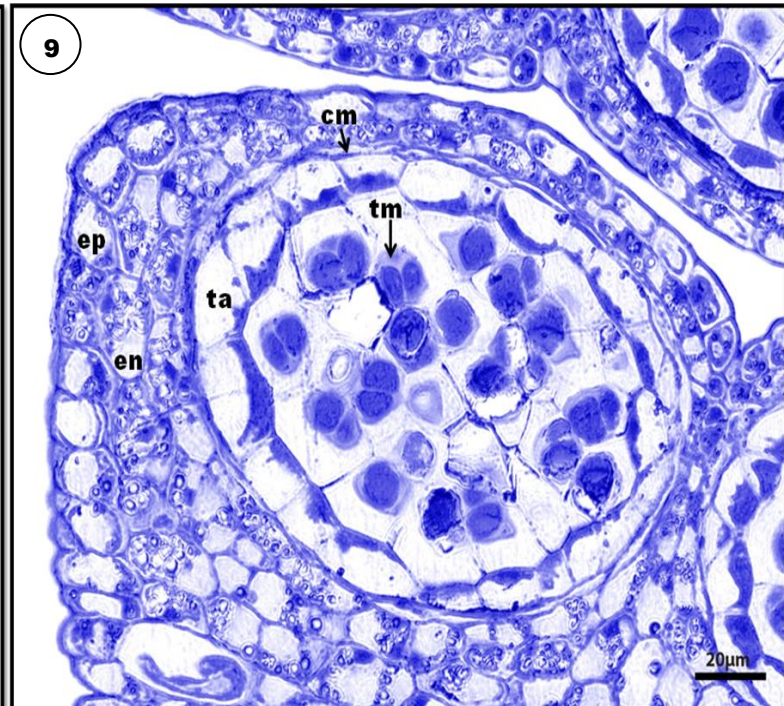
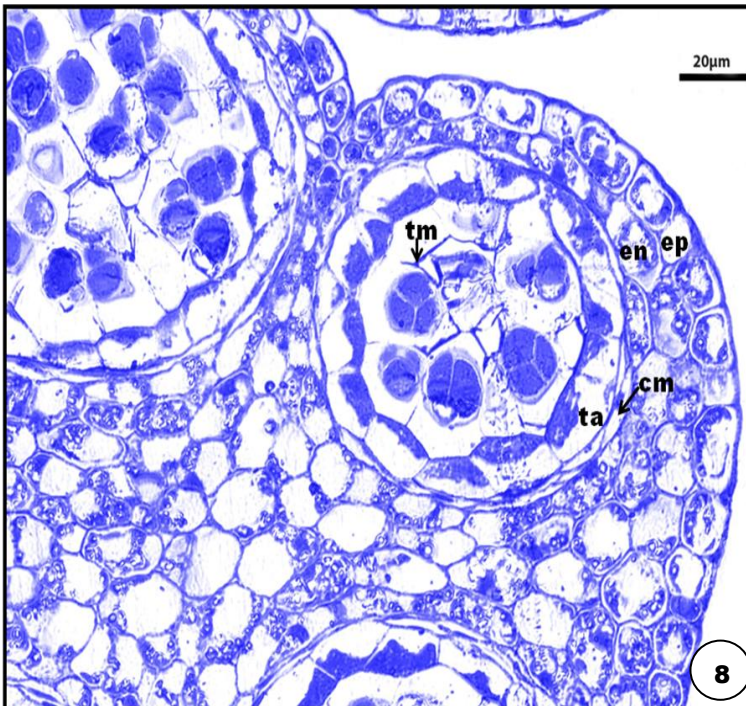
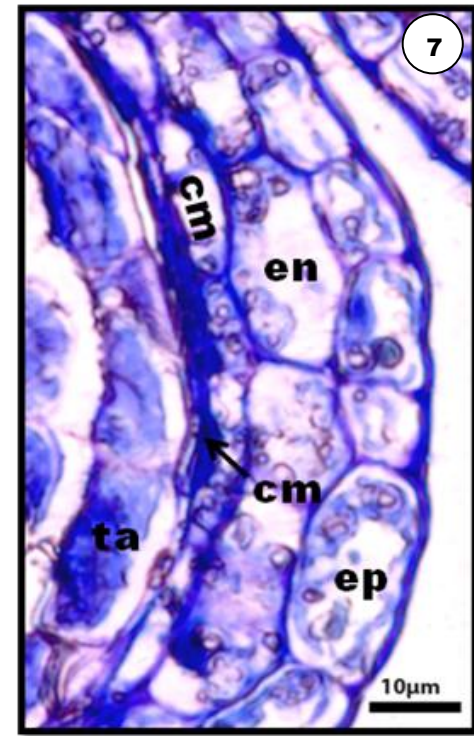
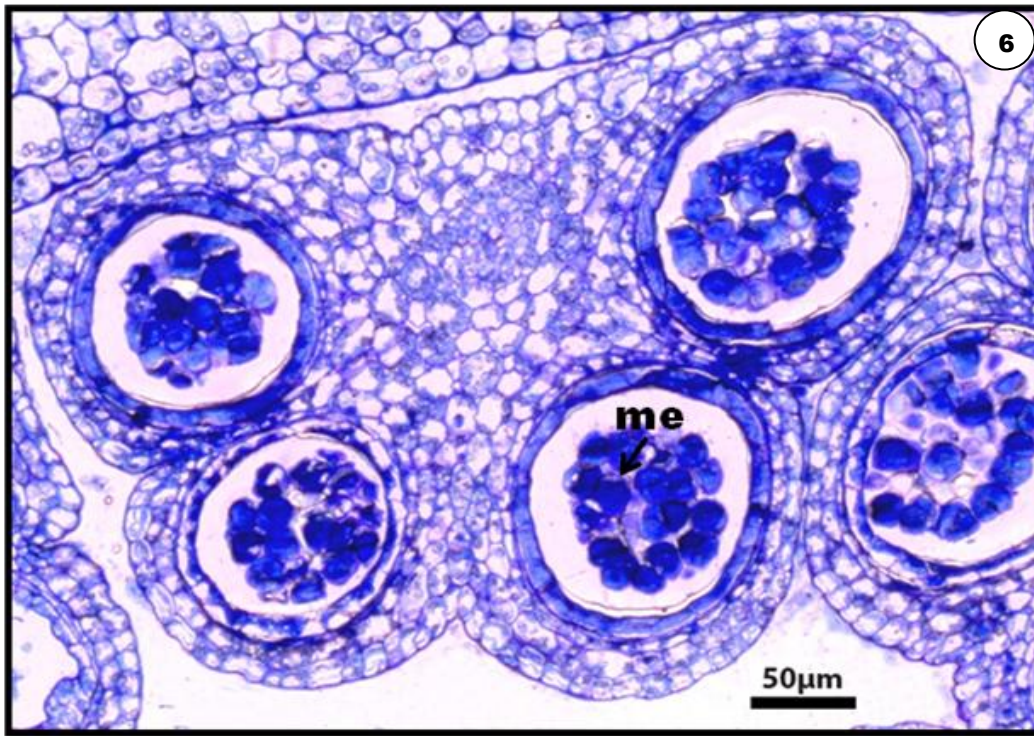


LÁMINA II
Microsporogénesis.

Figura 6. Sección transversal de la antera, se muestran los microsporocitos envueltos en una pared de calosa.

Figura 7. Capas de la pared de la antera momentos previos al inicio de la meiosis.

Figura 8. Tétradas tetraédricas envueltas por una capa de calosa.

Figura 9. Capas de la pared de la antera durante la etapa de tétradas de microsporas.

Capa media (cm), endotecio (en), epidermis (ep), meiocitos (me), tapete (ta), tétradas de microsporas (tm).

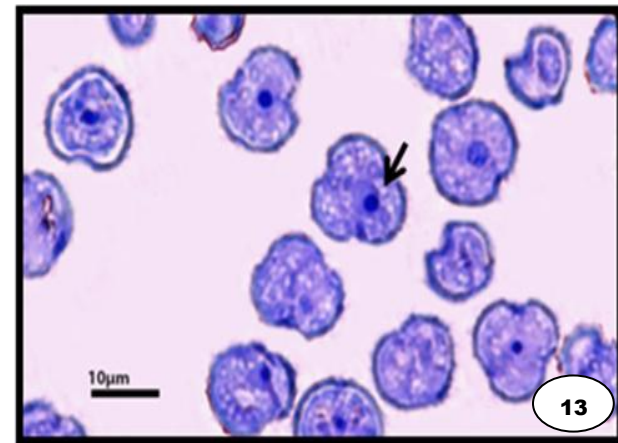
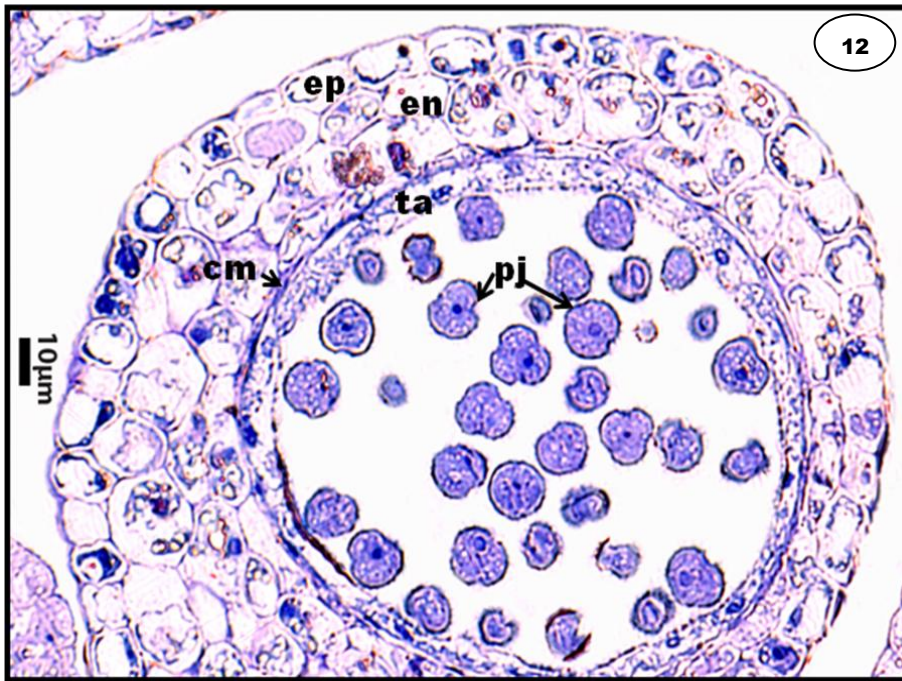
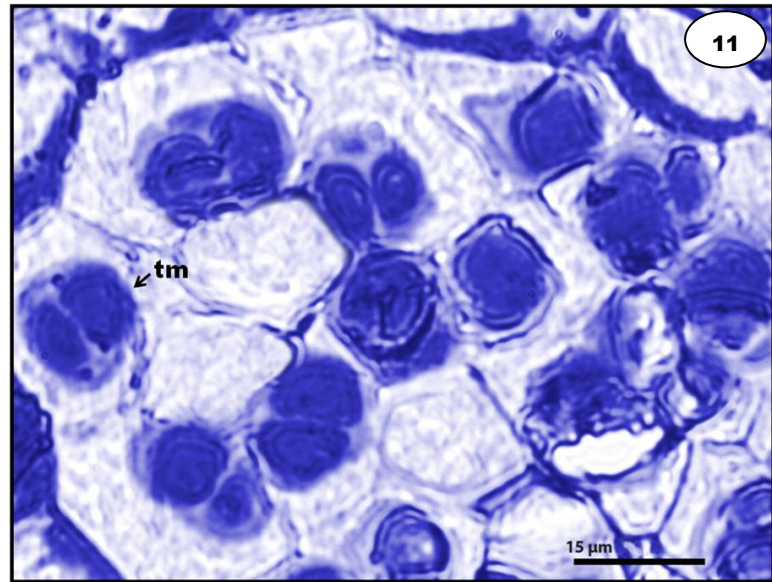
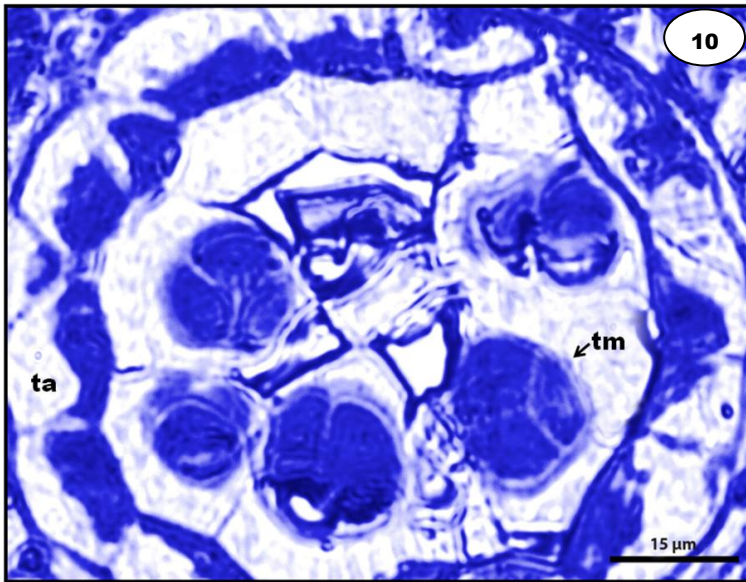


LÁMINA III

Tétradas de microsporas y granos de polen jóvenes.

Figura 10. Tétradas tetraédricas al finalizar la meiosis II.

Figura 11. Proceso asincrónico de formación de las tétradas de microsporas.

Figura 12. Capas de la pared de la antera al terminar la meiosis y microsporas libre o polen joven.

Figura 13. Granos de polen joven, presentan un único núcleo de posición central y un citoplasma denso.

Capa media (cm), endotecio (en), epidermis (ep), polen joven (pj), tapete (ta), tétradas de microsporas (tm), único núcleo del grano de polen joven (flecha en negro).

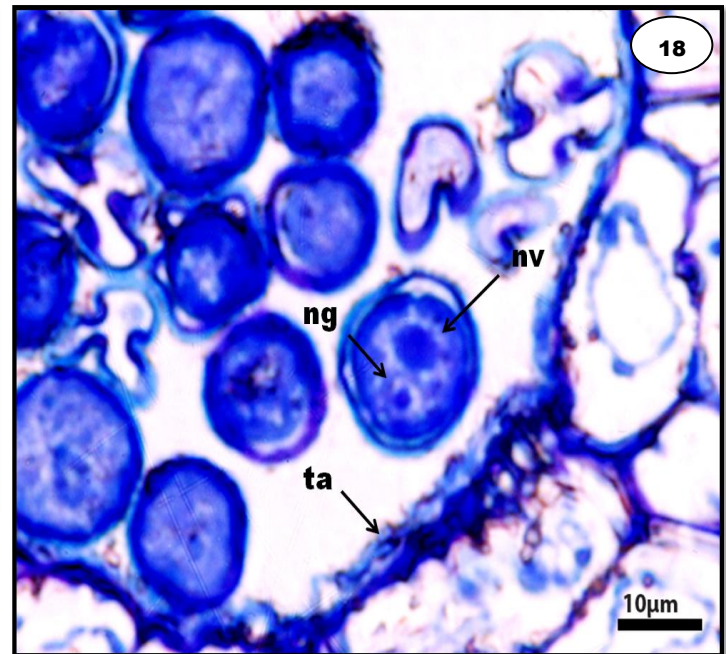
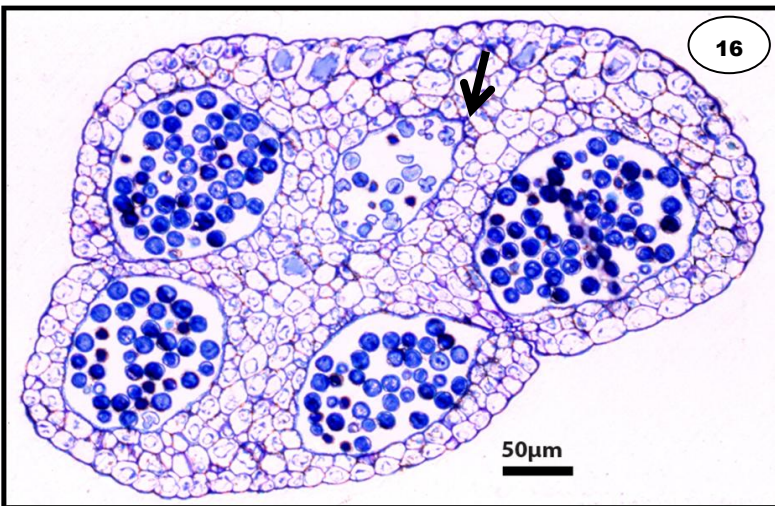
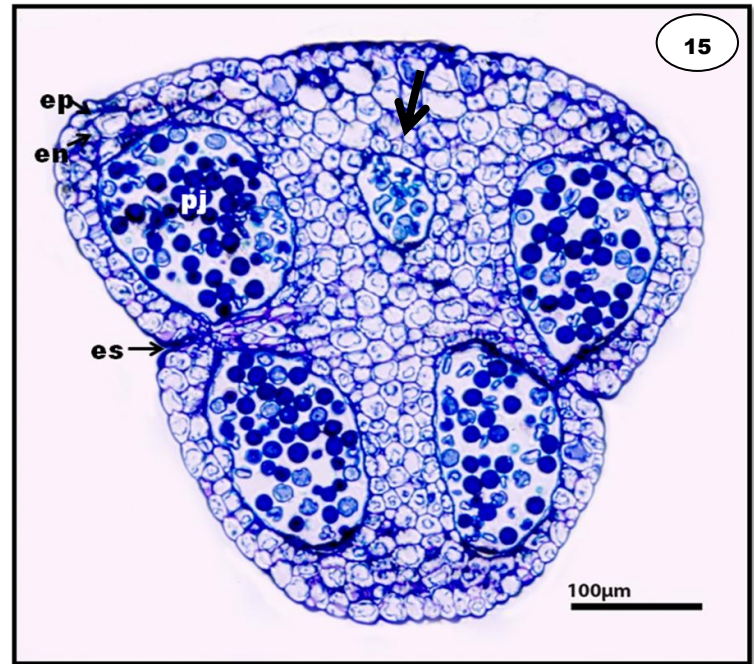
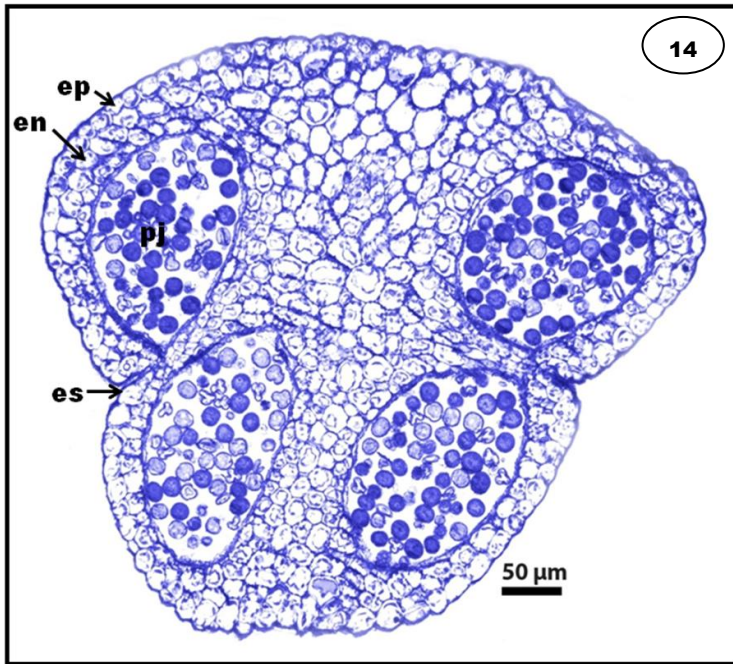


LÁMINA IV

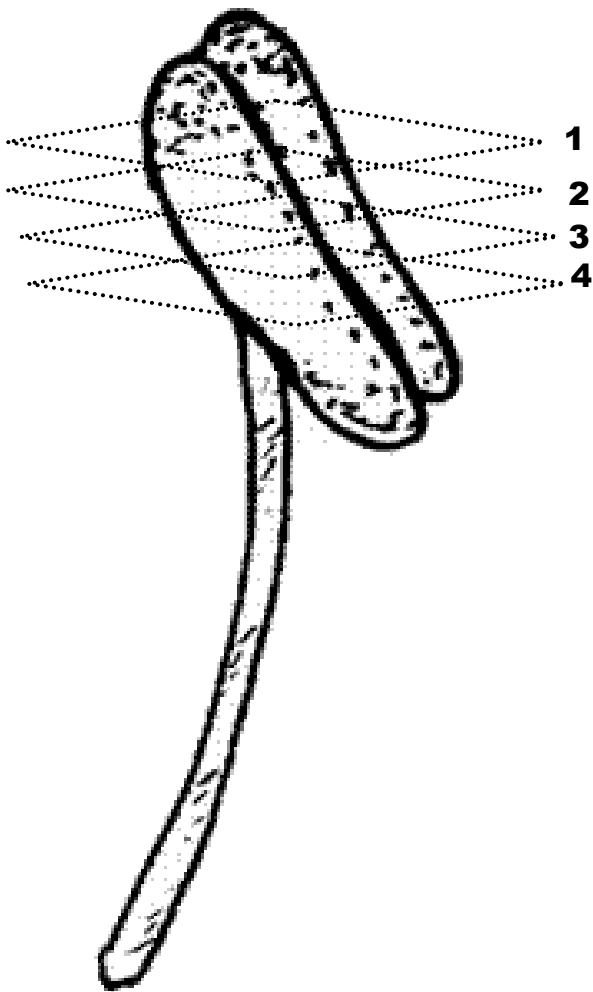
Anteras con cinco microsporangios y microgametogénesis.

Figura 14. Capas de la pared de la antera en botones florales que comienzan a sobresalir del cuerpo vegetativo de la planta pero aún cubiertas por la espátula.

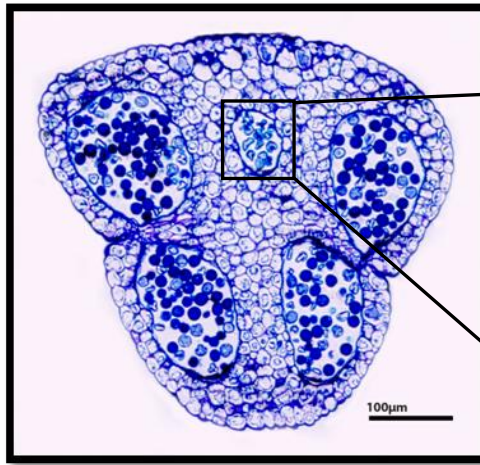
Figuras 15 y 16. Secciones transversales de anteras donde se muestra un esporangio adicional cuya posición corresponde a la del haz vascular en anteras normales.

Figura 18. Granos de polen maduro, se aprecian tanto el núcleo de la célula vegetativa como el de la célula generatriz.

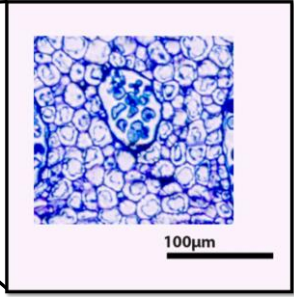
Endotecio (en), epidermis (ep), estomio (es), núcleo de la célula generatriz (ng), núcleo de la célula vegetativa (nv), polen joven (pj), microsporangio aberrante (flecha sola), microsporangio atrófico (flecha en sola).



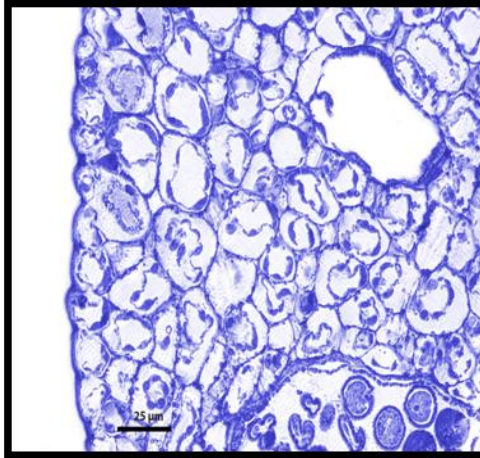
1



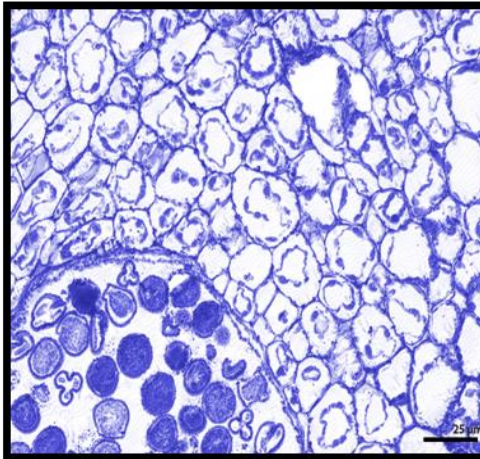
17



2



3



4

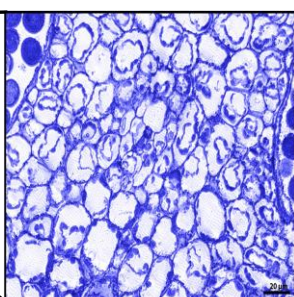
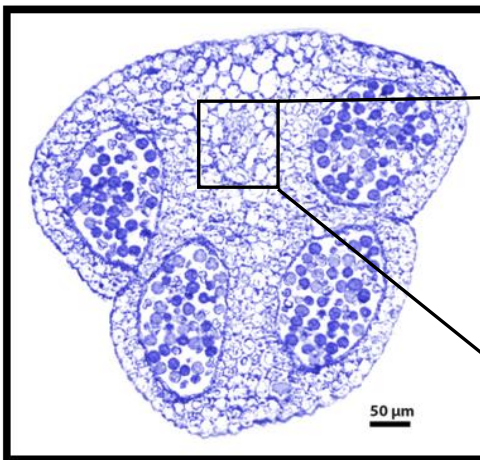


Figura 17. Secciones transversales sucesivas de antera de *M. schiedeanum*, se observa la presencia de un microsporangio adicional en la posición del haz vascular, mismo que retoma su lugar micras más abajo al finalizar el espacio ocupado por el microsporangio.

Con las recién formadas microsporas, ha concluido la microsporogénesis. De esta etapa en adelante, se formarán el o los gametos y la célula vegetativa por medio de la microgametogénesis.

En botones florales que sobresalen del cuerpo vegetativo de la planta, poseen un pedicelo de 2 a 4cm y se encuentran aún cubiertos por la espátela; alcanzan una longitud de entre 9 y 10mm; la pared de la antera está constituida sólo por la epidermis y el endotecio con engrosamientos de las paredes (figura 14). Los botones en esta etapa no se encuentran sumergidos.

En distintas anteras definidas como etapas de desarrollo similar, se presenta un quinto microsporangio de posición inusual (figuras 15 y 16).

En una serie de cortes sucesivos se observó que dicho microsporangio posee dimensiones significativamente menores que las de los microsporangios usuales; e inmediatamente después de él se halla el haz vascular (en una región cercana aún al ápice de la antera). En el interior, los granos de polen son morfológicamente anómalos; presenta formas irregulares y distintas a la del resto de los granos de polen de los otros microsporangios (figura 17).

En etapas posteriores se encuentran granos de polen bicelulares, es decir, polen maduro, que como resultado de la división mitótica desigual presentan un núcleo más grande, el de la célula vegetativa, cuyo citoplasma está delimitado por la pared del grano de polen y por otra parte también se puede observar un núcleo más pequeño, perteneciente a la célula generatriz, delimitado por una pared, el cuál se encuentra incluido en el citoplasma de la célula vegetativa, así se completa la microgametogénesis (figura 18).

En botones florales que ya han salido de la espátela; con una longitud de alrededor de 19mm con un pedicelo de aproximadamente 5cm, es posible observar el adelgazamiento del tejido conectivo entre los microsporangios de una misma teca y el estomio más pronunciado (figura 19).

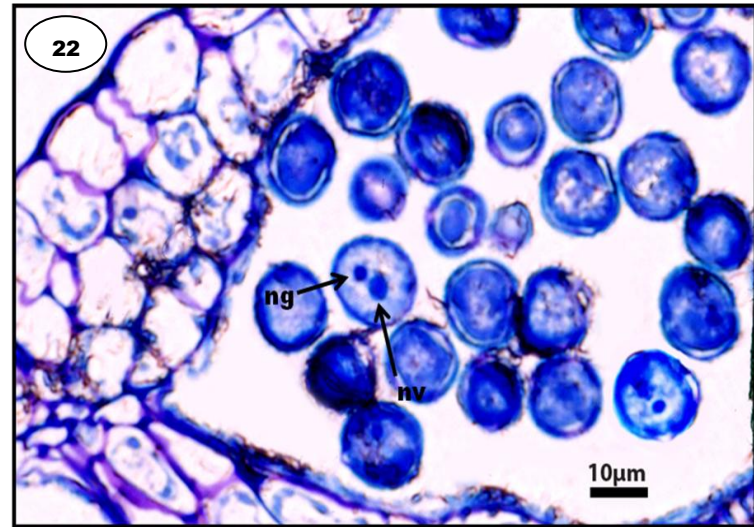
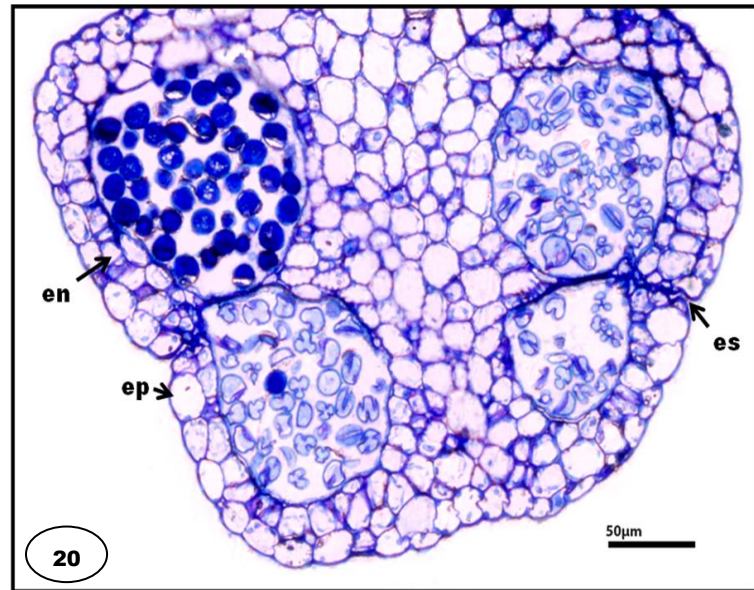
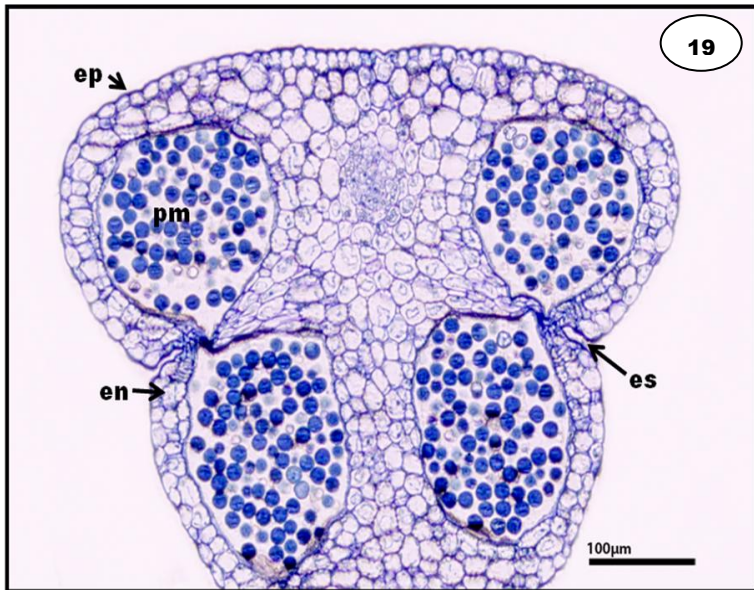


LÁMINA V

Anteras en etapas tardías, dehiscencia de la antera y liberación de los granos de polen maduros.

Figura 19. Capas de la pared de la antera en botones florales fuera de la espatela y pedicelo de aproximadamente 5cm.

Figura 20. Antera con tres microsporangios con polen de apariencia abortiva.

Figura 21. Dehiscencia longitudinal de la antera.

Figura 22. Granos de polen en estado bicelular.

Endotecio (en), epidermis (ep), estomio (es), núcleo de la célula generatriz (ng), núcleo de la célula vegetativa (nv), polen maduro (pm).

Se presentaron varias anteras con tres microsporangios con polen de apariencia abortiva y un solo microsporangio con polen normal (figura 20).

El porcentaje de anteras con aberraciones, ya sea con tres microsporangios estériles o con cinco microsporangios es para ambos casos alrededor de 7% de todo el material procesado (± 57 botones florales).

Finalmente las flores en antesis presentan un pedicelo de entre 5 y 6cm de longitud. La dehiscencia de la antera se da de manera longitudinal e introrsa (figura 21). Los granos de polen se liberan en mónadas, estado bicelular y son tricolpados (figura 13) y (figura 22).

Germinación de los granos de polen y crecimiento del tubo polínico

En las flores que fueron autopolinizadas se observó que aquellas con un tiempo de 2 horas posteriores a la polinización (HPP) que en los granos de polen adheridos sobre la superficie del estigma, no hubo la presencia de tubos polínicos (figura 23). En flores con 5 HPP, comienza la germinación de los granos de polen, por ello se observan algunos tubos polínicos; sin embargo el número de granos de polen sin germinar fue mucho mayor que el de los ya germinados. La longitud de los tubos polínicos no rebasa la cuarta parte de la longitud del estigma (figura 24).

Las flores con 7 HPP muestran una alta germinación de los granos de polen (~90%); sus tubos polínicos alcanzan una longitud que rebasa la mitad del estigma (figura 25). Aún es posible observar algunos granos de polen solo adheridos en la superficie del estigma sin germinar.

El porcentaje de germinación de los granos de polen procedentes de flores con 9 HPP es mayor al 90%, la longitud de los tubos polínicos que se observan alcanza en este momento la base del estigma (figura 26).

En las flores con 24 HPP, la germinación del polen es cercana al 100%, los tubos polínicos rebasan la base del estigma y se dirigen hacia la zona de la placenta (figuras 27 y 28)

También se registraron observaciones de las flores que fueron polinizadas de manera cruzada, mediante la obtención de cortes finos e inmunolocalización de calosa y tinción de DNA. Los tiempos de colecta observados son de 45 minutos post-polinización, una, dos y 4 horas. En el primer caso, solo fue posible observar los granos de polen en el estigma, ninguno de ellos con tubo polínico. A una HPP se encontraron los granos de polen en la superficie estigmática con un tubo polínico extremadamente corto, mismo que no rebasó una cuarta parte de las células estigmáticas. A dos HPP, en el estigma no se observaron los granos de polen.

Después de cuatro HPP se encontraron un gran número de granos de polen germinados consecuentemente, tubos polínicos, todos ellos aún en el estigma (lámina VII).

Estos tubos polínicos presentan dos núcleos con morfología diferente. La posición de uno de ellos en el tubo polínico es distal y su forma es más grande y alargada con respecto al otro núcleo, cuya posición es proximal (ambos respecto al ápice del tubo polínico), el tamaño de este último pequeño en comparación con el otro núcleo, por lo que resulta contundente pensar que se trata del núcleo de la célula vegetativa y el núcleo de la célula generatriz respectivamente. Dichos tubos polínicos fueron hallados aún dentro de la zona estigmática, y su longitud apenas alcanzaba una cuarta parte del estigma aproximadamente (lámina VIII).

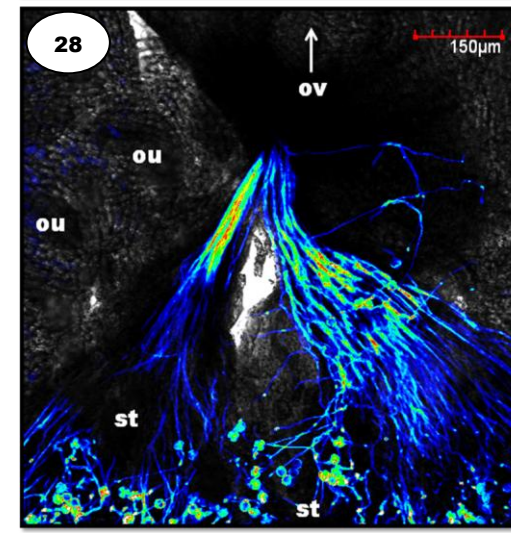
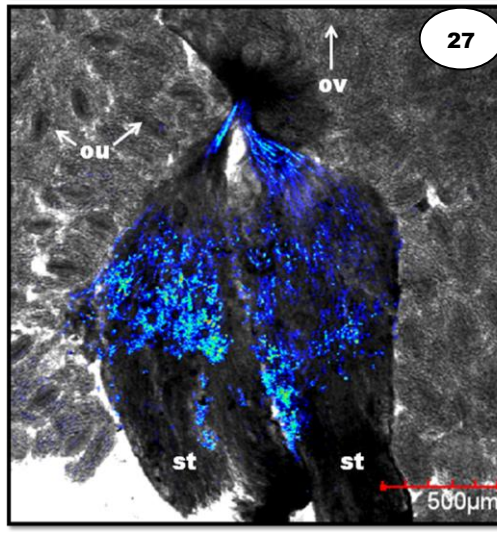
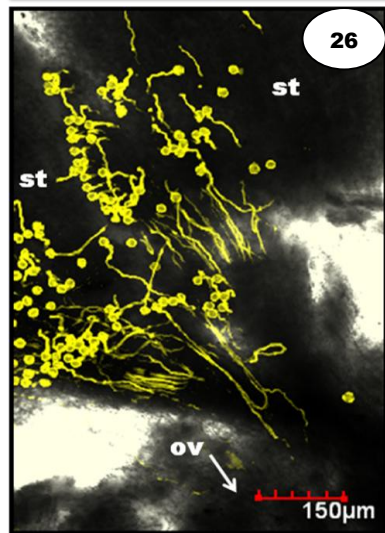
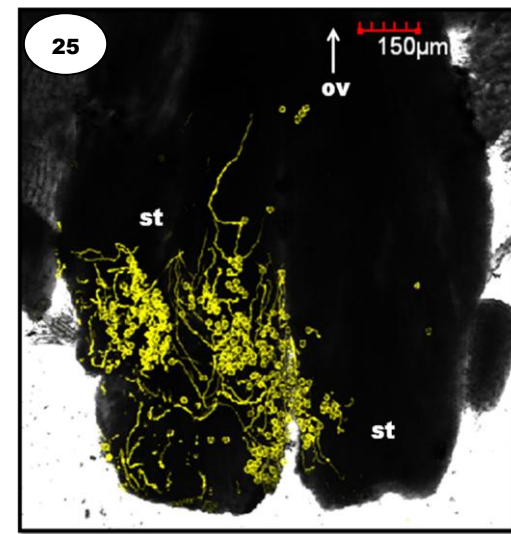
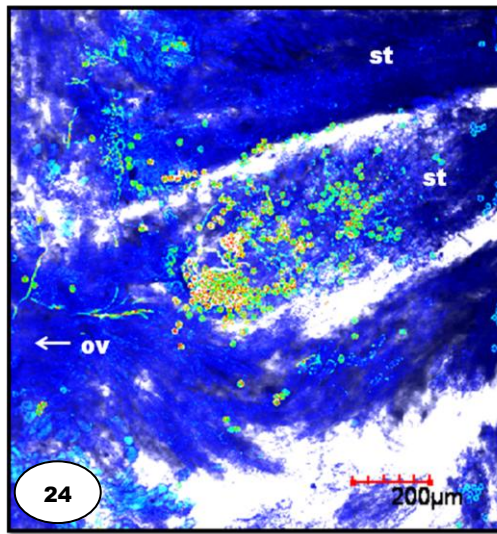
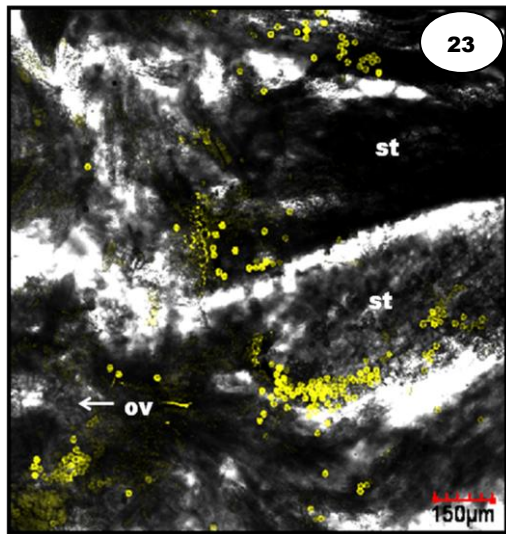


LÁMINA VI

Germinación de granos de polen y crecimiento del tubo polínico a distintos tiempos posteriores a la polinización.

Figura 23. Dos horas post-polinización. Acoplamiento. Campo oscuro.













Figura 24. Cinco horas post-polinización. Acoplamiento. Campo oscuro.

Figura 25. Siete horas post-polinización. Acoplamiento. Campo oscuro.

Figura 26. Nueve horas post-polinización. Acoplamiento. Campo oscuro.

Figura 27. Veinticuatro horas post-polinización. Acoplamiento. Campo oscuro.

Figura 28. Veinticuatro horas post-polinización. Acoplamiento. Campo oscuro.

	Azul de anilina (polen)		Tejido estigmático
	Azul de anilina (polen y tubos polínicos)		Tejido estigmático
	Azul de anilina (polen y tubos polínicos)		Tejido estigmático
	Azul de anilina (polen y tubos polínicos)		Tejido estigmático
	Azul de anilina (polen y tubos polínicos)		Tejido estigmático
	Azul de anilina (polen y tubos polínicos)		Tejido estigmático

Estigma (st), óvulo (ou), ovario (ov).

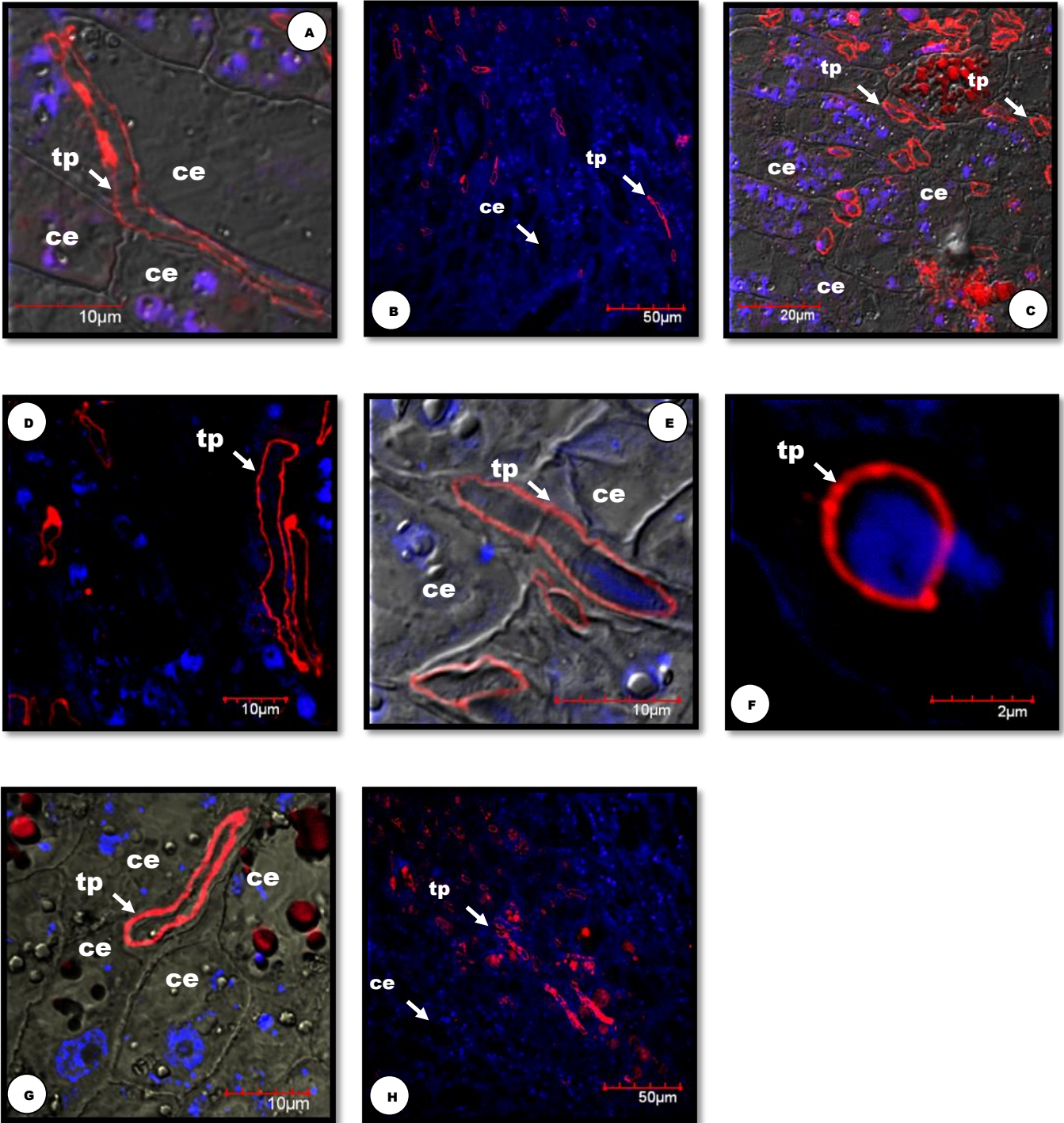


LÁMINA VII

Germinación de granos de polen y crecimiento del tubo polínico a 4 horas posteriores a la polinización.

Tubos polínicos a 4 horas post-polinización creciendo en el estigma.

A, C, E, G. Acoplamiento en campo claro.

B, D, F, H. Acoplamiento en campo oscuro.

Célula del estigma (ce), tubo polínico (tp).



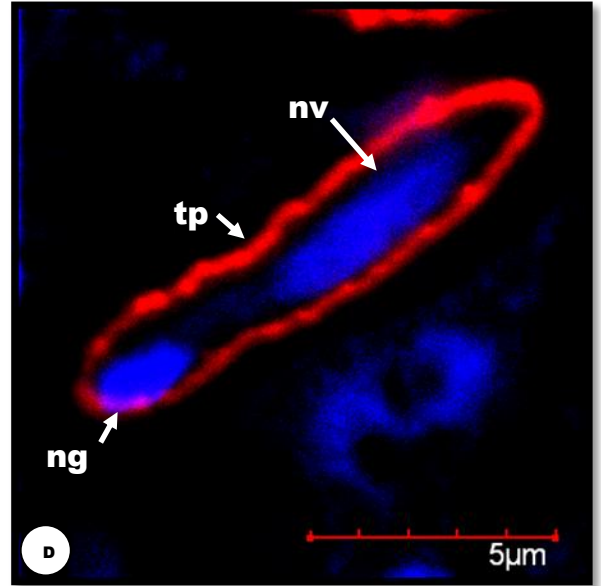
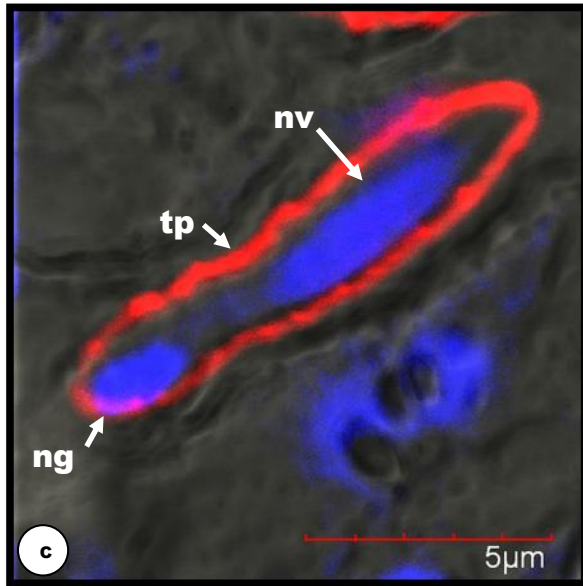
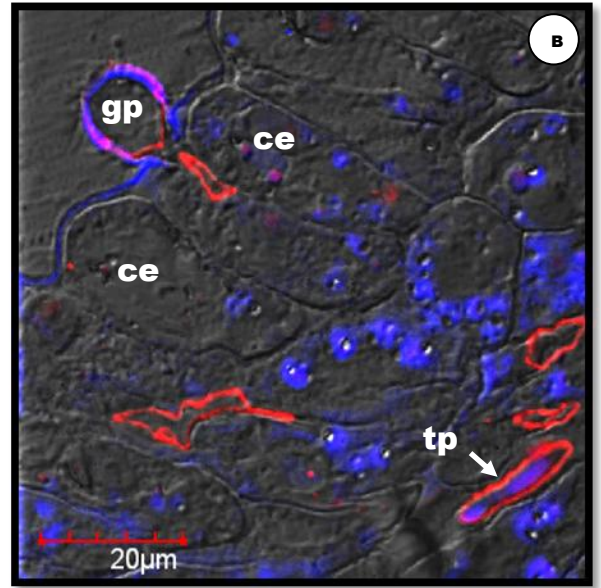
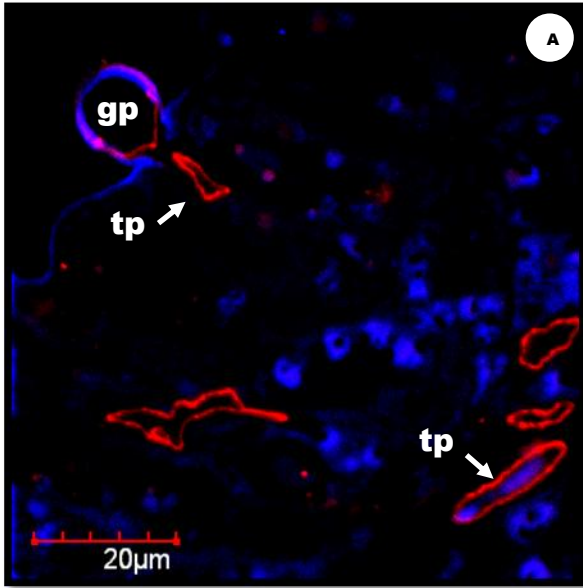


LÁMINA VIII

Crecimiento del tubo polínico a 4 horas posteriores a la polinización.

Tubo polínico a 4 horas post-polinización, se observa el núcleo de la célula vegetativa y el de la célula generatriz.
 A y D. Acoplamiento en campo oscuro.
 B y C. Acoplamiento en campo claro.

Célula del estigma (ce), grano de polen (gp), núcleo de la célula generatriz (ng), núcleo de la célula vegetativa (nv), tubo polínico (tp).



DISCUSIÓN

Desarrollo temprano del gineceo y androceo

Murguía-Sánchez (2003) menciona que para dos especies de la subfamilia Podostemoideae (*Marathrum rubrum* y *Vanroyenella plumosa*) el desarrollo de los órganos reproductivos ocurre en las primeras etapas de la diferenciación floral, cuando la longitud de los botones florales es menor de 5mm; lo mismo sucede en *Marathrum schiedeanum*.

Como lo reportan Mohan Ram y Sehgal (1997), en las podostemáceas existe una relación directa entre la disminución del nivel del agua y el inicio del periodo de floración. Por ello, en tallos que se encuentran aún sumergidos, el androceo y gineceo se observan en etapas avanzadas de su desarrollo, esperando los estímulos ambientales para comenzar inmediatamente la floración, como se pudo constatar en *M. schiedeanum*.

Los procesos de desarrollo de androceo y gineceo en podostemáceas suceden en el tallo durante la fase vegetativa, misma que se encuentra por debajo del agua, lo que representa una dificultad para su estudio dado que es imposible marcarlos.

Desarrollo de la pared de la antera

La etapa más temprana del androceo aquí estudiada había rebasado ya la fase de inicio, razón por la cuál el tipo de desarrollo de la pared de la antera no pudo ser determinado con precisión, sin embargo, por el número de capas que integran la pared de la antera inmadura, es posible ubicarla entre el tipo dicotiledóneo o el monocotiledóneo; dos de los cuatro tipos de desarrollo reconocidos por Davis (1966). Se llega a esta determinación dado que la pared de la antera se conforma de cuatro capas; epidermis, endotecio, capa media y tapete, cada una de ellas representadas por sólo un estrato celular; dicha descripción corresponde a la de los ya mencionados tipos de desarrollo, no obstante, su origen permanece desconocido. Ya que no se sabe si el endotecio y la capa media fueron originados a partir de la división de la capa parietal secundaria externa mientras que la

interna se diferenci6 directamente en el tapete (patr6n dicotiled6neo) o bien, si la capa parietal secundaria externa form6 el endotecio mientras que la capa parietal secundaria interna se dividi6 para originar la capa media y el tapete (patr6n monocotiled6neo).

El tipo de desarrollo de la pared de la antera es un car6cter que no se encuentra en la diagnosis de la familia Podostemaceae pues se desconoce para la mayoria de las especies que la integran; inclusive en especies como *M. rubrum* donde se han hecho estudios para conocer su embriologia (Murguia-S6nchez, 2003), dicho car6cter no se ha determinado por causas similares a las del presente estudio.

Es importante remarcar que para determinar con precisi6n el tipo de desarrollo de la pared de la antera es necesario no solo seguir la actividad mit6tica de las capas parietales secundarias en un inicio, sino tambi6n las divisiones posteriores a la morfog6nesis, por ejemplo, J6ger-Z6rn *et al.*, (2005) reportan para *M. rubrum* un n6mero variable de 2, 3 o hasta 4 capas de la pared de la antera, siendo 6stas la epidermis, uno o dos estratos celulares de endotecio y una capa media (no consideran al tapete); de esta manera no es posible identificar el tipo de desarrollo de la pared de la antera, dado que no se precisa la etapa o las etapas de desarrollo en las cuales se est6n haciendo dichas observaciones. J6ger-Z6rn (1997) reporta para *Weddellina squamulosa* 4 o 5 capas de la pared de la antera, con una o dos capas medias, no obstante al no ser reportado la etapa de desarrollo de la observaci6n, nuevamente no es posible determinar si en el caso de existir 5 capas (epidermis, endotecio, dos capas medias y tapete), la segunda capa media se forma en la etapa de morfog6nesis o posterior a ella, como en el caso de *M. schiedeanaum*, donde la segunda capa media observada fue producto de una divisi6n de la capa media preexistente, por ello en *W. squamulosa* el tipo de desarrollo de la pared de la antera puede corresponder a los tipos, b6sico, monocotiled6neo o dicotiled6neo.

La acumulaci6n de almid6n, tal como se observ6 en *M. schiedeanaum*, ha sido ya observada en capas como la epidermis y el endotecio en otras podostem6ceas, como lo

reportan Murguía-Sánchez *et al.*, (2001) para *Vanroyenella plumosa* en etapas de desarrollo similares, sin embargo, en *M. schiedeanum* la cantidad de dicho polisacárido de reserva es significativamente menor después de la microsporogénesis mientras que en *V. plumosa* es abundante aún en la etapa de polen bicelular.

Pacini (1996) menciona que los azúcares solubles e hidratos de carbono producidos en las capas de la antera como el tapete y absorbidos por el polen en desarrollo, pueden ser metabolizados de inmediato, utilizados por la microspora como precursores para la intina, convertidos en otras moléculas, o almacenados como reservas de polisacáridos.

Cuando las células madre de las microsporas sintetizan la pared de calosa, se observa una capa media bien definida, la otra en un estado de degeneración muy avanzado y el tapete (cuya densidad citoplasmática y tamaño de sus células indican un momento de máxima actividad biológica); contrario a ello, Murguía-Sánchez, (2003) reporta para *Tritischa trifaria* (Tristichoideae), *Oserya coulteriana*, *Podostemum riccifforme*, *V. plumosa* y *M. rubrum* (Podostemoideae) que las capas medias en la misma etapa han desaparecido persistiendo solamente la epidermis, el endotecio y el tapete; y que este último es conspicuo y biológicamente activo durante la microsporogénesis y la microgametogénesis. En *M. schiedeanum* el tapete registra un grado de degeneración considerable tras la microsporogénesis, es decir, cuando las microsporas yacen libres de calosa en el interior del lóculo y en etapas previas a la microgametogénesis el tapete se desintegra por completo, persistiendo únicamente la epidermis y el endotecio. Esto puede evidenciar que a diferencia de las cinco especies mencionadas, en *M. schiedeanum*, el tapete tiene su mayor participación e influencia durante la microgametogénesis y muy tempranamente después de la meiosis; no obstante la microgametogénesis es un proceso controlado por la expresión del genoma gametofítico, lo cual difiere con lo también visto por la misma autora al mencionar que en *T. trifaria*, el tapete persiste aún cuando la pared del grano de polen ya se formó, por lo que se sugiere que en dicha especie la maduración

del gametofito masculino y la formación de su pared puede estar controlada por aportes intercalados del esporofito (tapete) y del gametofito (microspora). Cabe destacar que esta marcada diferencia del tapete es entre especies de subfamilias distintas, Tristichoideae, para *T. trifaria* y Podostemoideae para *M. schiedeanum*. Por ello, será necesario que en estudios posteriores se analice con atención la actividad del tapete, para determinar si dicha característica también reafirma la división de ambas subfamilias.

Comparación del desarrollo del gametofito masculino en distintas especies

A primera vista es posible observar que la información es escasa e incompleta en las tres subfamilias de la familia Podostemaceae (Kita y Kato, 2001). No obstante, se observa que el comportamiento de dichos caracteres embriológicos no muestra un patrón de regularidad, no solamente de las especies a nivel de familia sino más aún en especies de la misma subfamilia.

Capas y tipo de desarrollo de la pared de la antera

Acerca del número de capas que conforman la pared de la antera inmadura, existe en la literatura un número variable: dos para *M. rubrum* (Jäger-Zürn *et al.*, 2005) hasta cinco para *V. plumosa* (Murguía-Sánchez, 2003); sin embargo hay cierta tendencia a ser cuatro (como en *M. schiedeanum*) el número de capas en la mayoría de las especies de Podostemaceae. Dicho rango naturalmente sugiere una variabilidad en el número y tipos de desarrollo de la pared de la antera; así pues se presentan en la familia Podostemaceae los tipos básico, monocotiledóneo y dicotiledóneo. Dentro de la subfamilia Podostemoideae se presentan con seguridad al menos dos tipos: el básico para *V. plumosa* (Murguía-Sánchez *et al.*, 2001) y alguno de los tipos monocotiledóneo o dicotiledóneo como en *M. schiedeanum*, donde el origen de las capas no pudo ser establecido concretamente.

Respecto a la subfamilia Tristichoideae hay que mencionar que están presentes los tipos monocotiledóneo y dicotiledóneo de desarrollo de la pared de la antera para *Indotristicha*

ramosissima (Chopra y Mukkada, 1966) y *T. trifaria* (Murguía-Sánchez, 2003), respectivamente.

Mientras tanto, para Weddellinoideae, Jäger-Zürn (1997) menciona que la pared de la antera de *W. squamulosa* está conformada de 4-5 capas, por ello no es posible precisar entre los tipos básico, monocotiledóneo o dicotiledóneo.

Con tal información queda demostrado que para la familia Podostemaceae no hay un único y distintivo tipo de desarrollo de la pared de la antera oponiéndose a lo dicho por Davis (1966) respecto a que este carácter es distintivo a nivel familia.

Tapete

Johri *et al.* (1992) menciona como característica diagnóstica de la familia el tapete tipo glandular o secretor; que de acuerdo a la literatura y a lo mostrado en *M. schiedeanum*, es uno de los pocos caracteres embriológicos que uniforman a la familia.

Microsporogénesis, citocinesis y tétradas

Según Furness *et al.* (2002), la microsporogénesis es un carácter poco estable en las angiospermas tempranamente divergentes, incluso se encuentran formas intermedias, entre ellas el tipo “simultáneo modificado”; tal diversidad refleja un rango de variación en el número y posición de las aperturas del polen en las angiospermas basales, aunque ambos tipos de polen, monosulcado e inaperturado pueden presentarse en combinación con cualquiera de los tipos de microsporogénesis, ya sea simultáneo o sucesivo. Sin embargo, muchos taxones con polen inaperturado presentan microsporogénesis sucesiva, mientras que muchos con polen monosulcado tienen tipo simultáneo (aunque el patrón sucesivo y polen monosulcado son comunes en monocotiledóneas).

El predominio de la microsporogénesis simultánea en las angiospermas basales existentes y en las plantas terrestres en general (incluidas las gimnospermas) indica que se trata de un carácter plesiomórfico en las angiospermas, mientras que el tipo sucesivo caracteriza a algunos grupos, principalmente de monocotiledóneas.

Furness (1999) y Rudall (2000) señalan que dentro de las monocotiledóneas se ha demostrado que la microsporogénesis es un carácter significativo a nivel de orden. Aunque el tipo predominante de microsporogénesis es sucesivo como en *Leiothrix fluitans*, Eriocaulaceae (Coan *et al.*, 2007), el simultáneo ha evolucionado independientemente en varios grupos de monocotiledóneas. Por ejemplo la microsporogénesis simultánea es una sinapomorfía para el orden Asparagales, con una subsecuente inversión al tipo sucesivo en los miembros superiores de dicho orden (Rudall *et al.*, 1997).

En algunas gimnospermas se ha observado ambos tipos de microsporogénesis al interior de una misma familia, como sucede en Zamiaceae, donde Audran (1981) señala que en *Ceratozamia* sucede el tipo simultáneo mientras que *Macrozamia* está reportado como sucesivo (Baird, 1939).

En *Chrysanthemum morifolium* (Asteraceae) ocurre el tipo simultáneo durante la microsporogénesis, con tétradas tetraédricas y una pequeña porción de tétradas decusadas (Li *et al.*, 2010).

Furness *et al.* (2002) señalan que las Eudicotiledóneas se caracterizan por presentar aperturas ecuatoriales tricolpadas, tricolporadas o tricolpadas derivadas en el grano de polen (por lo que el patrón de apertura del polen se considera un carácter crítico a este nivel). Con muy pocas excepciones, la mayoría de las eudicotiledóneas presentan el patrón simultáneo durante la microsporogénesis, aunque ambos, sucesivo y simultáneo se han registrado en clados de eudicotiledóneas tempranamente divergentes como en el género *Nelumbo* en Proteales (Kreunen y Osborn 1999,) y en Proteaceae (Blackmore y Barnes 1995), donde en *Grevillea* es simultáneo y sucesivo en *Dyandra*. González *et al.* (2001) observaron que durante la microsporogénesis en *Aristolochia* (Piperales) ocurre el patrón simultáneo de citocinesis, que produce distintas configuraciones de la tétrada, entre ellas la tetragonal (asociada normalmente al patrón sucesivo); mientras tanto en

Galbulimima (Magnoliales), la microsporogénesis sucesiva además de las configuraciones decusada, isobilateral, lineal, en forma de T, también se encontró la tetraédrica (asociada al patrón de citocinesis simultáneo).

Furness *et al.* (2002), mencionan que durante la microsporogénesis en las plantas heterospóricas, dos tipos de citocinesis pueden ocurrir, el tipo simultáneo y el sucesivo; como resultado del primero al final de la meiosis, el tipo de tétrada (más ampliamente observado) de microsporas formado presenta una disposición tetraédrica, mientras el segundo tipo puede resultar en cuatro distintos arreglos, tetragonal, decusado o isobilateral, lineal y en forma de "T".

En monocotiledóneas y eudicotiledóneas, la tipología existente para la configuración de las tétradas durante la microsporogénesis representa un método útil y práctico para su caracterización, sin embargo, varios grupos de angiospermas basales, aparentemente, tienen formas intermedias que no encajan fácilmente en las categorías simultáneo o sucesivo.

Furness *et al.* (2002) mencionan que el tipo de microsporogénesis suele ser consistente a nivel de familia sin embargo, es una característica variable en algunas familias tempranamente divergentes, de igual manera que en Podostemaceae.

El tipo de apertura en el grano de polen está altamente relacionado con los eventos más tempranos de la ontogenia; la microsporogénesis y la forma resultante de la tétrada así como la posición de las aperturas están controladas por la orientación de los microtúbulos del huso meiótico (Sheldon y Dickinson, 1986).

O' Neill *et al.* (1997) describieron la micromorfología y ultraestructura del grano de polen de cinco especies de Podostemaceae, cuatro de ellas pertenecientes a la subfamilia Podostemoideae (*M. rubrum*, *O. coulteriana*, *P. ceratophyllum* y *V. plumosa*) y una más a Tristichoideae (*T. trifaria*); encontrando que el polen es tricolpado para la primera, tercera y cuarta especie; de tri a pentacolpado, para la segunda y pantoporado para la quinta

especie. El patrón de aperturas de *M. schiedeanum* coincide con lo reportado para *M. rubrum*.

La inestabilidad en cuanto al patrón o patrones de citocinesis durante la microsporogénesis, parecer ser una característica estrechamente relacionada con las angiospermas basales o tempranamente divergentes; esto aunado a que el saco embrionario de las podostemáceas es tetracelular (Jäger-Zürn, 1997), son características que coinciden con lo observado en estudios recientes de algunos linajes de angiospermas basales (Friedman, 2001) por lo que podría pensarse que la posición taxonómica de la familia Podostemaceae estaría más relacionada con el grupo de angiospermas basales o tempranamente divergentes.

Sin embargo la evidencia palinológica disponible indica que en cuanto al tipo y número de aperturas en el grano de polen, esta familia se encuentra claramente dentro del grupo de Eudicotiledóneas, como lo demuestra el trabajo de Korotkova *et al.* (2009), donde con ayuda de secuencias del intrón petD grupo II, se emparenta a Podostemaceae en el orden de las Malpighiales, claramente dentro de las Eudicotiledóneas.

Existen reportes de mónadas espiroaperturadas en *M. schiedeanum*, lo cual se contrapone con el polen monosulcado e inaperturado de las angiospermas basales; pese a ello dichos autores opinan que la estructura de la pared polínica podría ser un carácter con implicaciones filogenéticas en algunos grupos y ecológicas en otros, en el caso de esta especie, las espiroaberturas se han interpretado como una adaptación que incrementa las posibilidades de sitios de germinación (Osborn *et al.*, 2000).

Esporangios en la antera

En Podostemaceae, existe uniformidad a desarrollarse cuatro microsporangios, como ocurre de manera habitual en otras especies de angiospermas, por ejemplo en *Agapanthus praecox*; (Zhang *et al.*, 2010), *Pterocactus* sp., (Gotelli *et al.*, 2009) y *Chrysanthemum morifolium*, (Li *et al.*, 2010). Sin embargo *M. schiedeanum* exhibe en

algunas anteras cinco microsporangios. Alrededor del quinto microsporangio no se observó tapete. Como lo reportan Li *et al.*, (2010), es altamente probable que la ausencia de tapete sea la causa de las aberraciones en los granos de polen. El microsporangio adicional encontrado en *M. schiedeanum* se sitúa adyacente al haz vascular. En anteras donde el haz vascular degenera, éstas no presentan dehiscencia (Li *et al.*, 2010) como en *C. morifolium*. Aberraciones de sacos polínicos han sido ya reportadas al menos para otra especie del mismo género, por Murguía-Sánchez (2003), quien en etapas similares de desarrollo, encontró en *M. rubrum* en una o dos de sus anteras aberraciones del saco polínico en una o en ambas tecas, suceso que produjo polen anómalo.

Núcleos en el polen maduro

Tanto en *M. schiedeanum* como en la gran mayoría de especies hasta ahora estudiadas, uno de los caracteres embriológicos con mayor uniformidad en la familia Podostemaceae son las dos células con las cuales se dispersan los granos de polen. En las especies así reportadas, se encontraban representadas las tres subfamilias, *W. squamulosa* (Weddellinoideae), Jäger – Zürn (1997); *T. trifaria* (Tristichoideae), Murguía-Sánchez (2003); y *V. plumosa* (Podostemoideae), (Murguía-Sánchez *et al.*, 2001). Sin embargo, existe un reporte reciente de Khosla y Sehgal (2009), quienes indican que para *Indotristicha ramosissima*, el polen se libera en estado tricelular, sin embargo la forma esférica de los tres núcleos, así como la disposición equidistante entre ellos pueden ser datos indicativos de una interpretación inadecuada.

Unidad de dispersión del polen y dehiscencia de la antera

M. schiedeanum concuerda con el tipo de unidad de dispersión de mónadas, que es uno de los tres reportados para la familia. El polen se dispersa igual que en *M. rubrum* (Jäger-Zürn *et al.*, 2005), sin embargo no se puede hablar de tal semejanza con otros integrantes incluso de la misma subfamilia, dado que se presentan diadas, como en *Podostemum subulatum* (Magnus, 1913), o inclusive tétradas como en *Diamantina lombardii* (Philbrick

et al., 2004). En cambio, el tipo introrso de dehiscencia de la antera es un carácter unificador para toda la familia.

En *M. schiedeanum*, cuando los botones ya sobresalen del cuerpo vegetativo de la planta y son cubiertos aún por su espatela, la microsporogénesis se ha completado.

Jäger – Zürn (1997) reporta que en *W. squamulosa* la meiosis y por tanto la formación de las microsporas ocurre rápidamente durante la antesis. Si bien no hay una descripción más detallada de la etapa en la cual ocurre la microsporogénesis y la maduración del gametofito masculino en *W. squamulosa*; ambos sucesos son referidos a momentos previos a la antesis, en contraparte en *M. schiedeanum*, la antesis es precedida por la maduración previa del grano de polen, la desintegración de las capas medias y el tapete, el adelgazamiento del tejido conectivo circundante a los microsporangios y la pérdida de la espatela, todo ello a través de un intervalo de tiempo que permite la elongación del pedicelo entre uno y dos centímetros adicionales a los cuatro que presenta cuando la microsporogénesis ya sucedió.

La comparación anterior permite observar que al menos entre estas dos especies de subfamilias distintas existen diferencias entre los tiempos y espacios donde sucede la maduración del gametofito masculino en referencia al momento de la antesis, teniendo en *M. schiedeanum* el polen maduro en flores más jóvenes y sumergidas todavía.

Los granos de polen de *M. schiedeanum* que se liberan durante la antesis, lo hacen en estado bicelular (por lo que no se sabe si las células espermáticas son mono o dimórficas) y es así como comienzan la polinización. Los procesos de maduración del gametofito masculino no sólo están influenciados por factores abióticos (como la temperatura principalmente) sino además por el propio genotipo (Tímár *et al.*, 1997). Así, encontramos especies como la mayoría de las estudiadas en Podostemaceae que se dispersan bicelulares o bien otras (de distintas familias) que lo hacen en estado tricelular, por

ejemplo *Aster subulatus*, *Kalimeris indica*, *Heteropappus arenarius* y *Erigeron annuus* (Asteraceae) como lo indican Ao *et al.* (2009).

Germinación de los granos de polen y crecimiento de los tubos polínicos

Respecto a la germinación de los granos de polen y crecimiento de los tubos polínicos en *M. schiedeanum*, existe diferencia entre los dos grupos de flores observados, es decir, entre el de tiempos de polinización de 2, 5, 7, 9 y 24 horas, examinados mediante la técnica de aplastado (flores autopolinizadas) y el conformado por las flores con tiempos de 45 minutos, una dos y cuatro horas (geitonogamia y xenogamia) observados a través de cortes finos e inmunolocalizaciones.

A pesar de sólo poder establecer una relación comparativa entre las flores de tiempos de polinización semejantes entre ambos grupos (dos horas en ambos grupos y 5 y 4 horas para el primer y segundo grupo respectivamente), también es posible notar diferencias entre las flores de ambos grupos en los distintos tiempos. Las diferencias radican principalmente en el número de granos de polen adheridos al estigma, el número de granos de polen germinados, la longitud y la apariencia de los tubos polínicos.

El tipo de polinización probada en el primer grupo es autogamia; por otra parte, en el segundo grupo fueron probadas la geitonogamia y la xenogamia.

Autogamia

Analizando de manera individual el comportamiento del primer grupo, se observan en todos los tiempos de polinización una gran cantidad de granos de polen en el estigma, ya sea que solo estén presentes (como en el estigma de las flores con dos horas de polinización) o que muestren tubo polínico (flores con 7, 9 y 24 horas de polinización). La abundante presencia de los granos de polen desde las primeras hasta las últimas horas, es referencia del reconocimiento positivo que existe entre el gametofito masculino y el estigma, por tanto el polen se adhiere fuertemente a las papilas estigmáticas. En cuanto al

crecimiento en sí de los tubos polínicos es a partir de las 5 horas posteriores a la polinización cuando comienza de manera progresiva, en dicho tiempo es posible distinguir algunos tubos creciendo a nivel de las papilas estigmáticas. La germinación abundante comienza entre 6 y 7 horas de polinización y conforme avanza el tiempo el porcentaje de granos de polen germinados así como el número de tubos polínicos en crecimiento aumenta vigorosamente, de tal manera que a las 24 horas post polinización existe una germinación aproximada del 100% de los granos de polen, encontrándose los tubos polínicos a través de todo el estigma y continuando su crecimiento hacia la placenta. Los tubos polínicos se observan como estructuras capilares de contornos bien definidos, continuos y sólidos muy evidentes. Desde las nueve horas posteriores a la polinización los tubos polínicos están cercanos a la base del estigma, zona que lo comunica directamente con el ovario.

Geitonogamia y xenogamia

En el caso del segundo grupo, en primera instancia se detecta una pobre adhesión de los granos de polen (en todos los tiempos) sobre las papilas estigmáticas receptoras; no obstante existe una respuesta positiva de reconocimiento, representada por los tubos polínicos encontrados. La germinación de los granos de polen no sucedió dentro de los primeros 45 minutos sino hasta la primera hora posterior a la polinización donde pocos y muy pequeños tubos polínicos fueron vistos sobre las papilas estigmáticas. A dos horas después de la polinización, en el estigma no se observaron los granos de polen, probablemente arrastrados mecánicamente debido a su pobre adhesión al estigma. Este intervalo de tiempo es comparable en ambos grupos; si bien en el primero de ellos no hay presencia de tubos polínicos, si hay un número considerable de granos de polen.

El siguiente intervalo de tiempos post-polinización es también comparable entre ambos grupos, y corresponde al tiempo de 5 y 4 horas para el primer y segundo grupo respectivamente. Por las características y el alcance de la técnica empleada en la revisión

de las flores del segundo grupo (4 horas post-polinización), fueron observados escasos tubos polínicos, mismos que apenas alcanzaban una cuarta parte del estigma o menos, no obstante, en uno de ellos fueron observados en su ápice, dos núcleos de morfología distinta, mismos que corresponde al núcleo de la célula vegetativa y al de la célula generatriz. Por otra parte, de los tubos polínicos observados en el primer grupo solo se puede decir que alcanzaban una longitud comparable a la mitad del estigma.

Al observar y comparar tal característica entre las flores del primer grupo con los intervalos de tiempo de 5, 7 y 9 horas (por ser los más próximos entre ellos), se aprecia que entre las flores de 5 y 7 horas posteriores a la polinización, la diferencia en longitud de los tubos polínicos es mínima. Lo mismo sucede entre los tubos polínicos de 7 y 9 horas; sin embargo la diferencia se hace más evidente al comparar los tubos polínicos de 5 con los de 9 horas, donde los primeros alcanzan una longitud cercana a la mitad del estigma y los segundos están próximos a llegar a la base del mismo.

Es notable que en las flores donde se probó la autogamia, el tubo polínico crece de manera más o menos constante la distancia equivalente a una cuarta parte de la longitud total del estigma cada dos horas; así, los tubos polínicos de flores con 5 horas de polinización rebasan la mitad del estigma; sin embargo tal ritmo de crecimiento no es el mismo para los tubos polínicos de las flores donde se probó la geitonogamia y la xenogamia, ya que la longitud de los tubos polínicos con cuatro horas de polinización apenas alcanzó una cuarta parte del estigma.

Con respecto a la morfología de los tubos polínicos del segundo grupo, muchos de ellos se observan como estructuras de contornos irregulares, comprimidas, discontinuas y algunos con engrosamientos de calosa en sus paredes.

Dichas características morfológicas aunadas a su escasas y al ritmo lento de crecimiento comparado con el primer grupo, sugieren la posibilidad de quedar arrestados deteniendo

así su avance. Tal posibilidad apunta que en *M. schiedeanum* existe un sistema de reproducción que tiende mayoritariamente a la autogamia.

La germinación del grano de polen es un proceso dependiente del reconocimiento positivo del polen en el estigma receptor y en las distintas especies ocurre a distintos intervalos de tiempo como en *Pistacia vera* (Anacardiaceae) (Shuraki y Sedgley, 1997) donde los granos de polen germinan en el estigma después de dos horas, y después de seis horas, los tubos penetran en el tejido del estigma entre las papilas.

En *Chaenomeles japonica* (Rosaceae), se observó cómo es que la interacción y el reconocimiento de los genomas gametofíticos masculino y femenino afectan la germinación de los granos de polen y la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos. En una combinación compatible, los granos de polen tuvieron una rápida germinación y los tubos polínicos crecieron también rápidamente, a través del tejido estilar. Mientras que en una combinación incompatible sólo unos pocos granos de polen germinaron y los tubos polínicos crecieron lentamente y a menudo se detuvieron completamente en el estilo (Kaufman y Rumpunen, 2002).

No obstante otro factor que puede influir en la germinación de los granos de polen es la receptividad del estigma, como en *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) donde dicho parámetro se evaluó mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos mediante polinización controlada, presentando la mayor receptividad a partir del día 1 al día 6, después de la antesis, disminuyendo rápidamente después de este intervalo de tiempo presentando niveles bajos de receptividad desde poco antes de la antesis y tan tarde como 10 días después de la polinización (Baskorowati *et al.*, 2010).

En Podostemaceae se ha observado la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico incluso en especies del mismo género, como en *M. rubrum*, donde Luna-Ramos (2006) reporta la presencia de tubos polínicos en flores autopolinizadas. También en flores autopolinizadas de *M. schiedeanum* así como en flores con polinización cruzada.

Por ello, en el presente estudio se esperaba una respuesta similar en cuanto a la presencia de los tubos polínicos en las flores de *M. schiedeanum*. Otra especie es *Polypleurum stylosum* donde Khosla *et al.* (2000) reportan que la germinación abundante del polen ocurrió dentro de las seis horas posteriores a la polinización; los tubos polínicos se limitaron principalmente a los estigmas; entraron en el ovario después de 12 a 14 horas y fueron vistos en el tejido de la placenta de 18 a 20 horas después de la polinización; en ese momento los tubos polínicos habían logrado entrar en pocos óvulos. La fecundación no fue observada y no se formó endospermo; por ello los autores sugieren más estudios con el fin de averiguar si existe apomixis.

Otra especie de Podostemaceae donde se ha estudiado la germinación de los granos de polen y el crecimiento del tubo polínico es *Indotristicha ramosissima* (Khosla y Sehgal, 2009), en esta especie se encontró que ambos sucesos toman lugar mediante la autopolinización y la polinización cruzada (manuales) y natural; sin embargo la mayor germinación de granos de polen (95%) ocurrió en la flores polinizadas naturalmente y en las autopolinizadas de manera manual. Los tubos polínicos alcanzaron la base de la estigma entre las 4 y 5 horas, alcanzaron el extremo del ovario entre las 8 y 10 horas y entraron a los óvulos entre 16 a 20 horas posteriores a la polinización en ambos tipos de polinización.

En estas tres especies se puede observar que existe una respuesta de germinación de los granos de polen similar, misma que se da dentro de un periodo de 4 a 6 horas, sin embargo el ritmo al cual crecen los tubos polínicos si presenta mayor diferencia, siendo *P. stylosum*, la especie con un crecimiento más lento, después *M. schiedeanum* e *I. ramosissima* la especie con mayor velocidad de crecimiento.

La reducción de los verticilos vegetativos en la morfología de la flor en *M. schiedeanum* sugiere un síndrome o sistema de polinización por medio del viento, es decir, anemofilia; y tal como sucede en otros géneros de la misma familia (Oserya, *Tristicha* y *Vanroyenella*),

además de carecer de un perianto vistoso, *M. schiedeanum* carece de aroma y néctar. Adicionalmente en especies de *Marathrum* y *V. plumosa*, el polen se dispersa seco durante la dehiscencia de las anteras por la brisa (Philbrick y Novelo 1997). En la disposición de las anteras en la flor de *M. schiedeanum*, se puede observar que al abrir las anteras la estructura más cercana sobre la cual cae el polen es el estigma de la misma flor, lo mismo sucede en *I. ramosissima* (Khosla y Sehgal, 2009) donde el 90% del polen es transferido de manera natural únicamente por la disposición de las anteras sobre el estigma.

Estas características apoyan a la autogamia como principal sistema reproductivo al menos en estos géneros, sin embargo Philbrick y Novelo (1997) señalan que esporádicamente (y solo en algunas poblaciones) pequeñas moscas visitan las anteras de las especies de *Marathrum* por lo que probablemente su sistema de polinización además del viento también intervengan vectores biológicos.

En el género *Marathrum*, la posibilidad de encontrar un sistema de reproducción donde además de la autogamia exista un pequeño porcentaje de polinización cruzada está respaldada por estudios como el de Philbrick y Novelo (1998), donde se observó que las flores de *M. rubrum* son protóginas. Después de romper la espátula el pedicelo se alargó de 10 a 24mm, y se observó que el estigma es receptivo desde que la flor salió de la espátula.

Este desplazamiento temporal de la actividad receptiva de los estigmas abre la posibilidad de recibir por medio del viento polen de plantas adyacentes. Así en otro estudio de Philbrick y Novelo (1997b) en *M. rubrum* se demostró que hasta un 10% de semillas producidas en flores experimentales fueron el resultado del transporte de polen entre las plantas. Con ello se corrobora que existe en la familia, y más aún en el género un pequeño porcentaje de polinización cruzada, aunque prevalece la autopolinización.

Además estudios más recientes como el realizado por Luna-Ramos (2010), confirman que existe incluso compatibilidad entre las especies *M. rubrum* y *M. schiedeanum*, y que el sistema reproductivo en ambas especies es mixto, con una mayor producción de semillas por vía autógama que por vía alógama.

La autopolinización es una característica generalizada en las plantas acuáticas y se ha interpretado como una respuesta a situaciones ecológicas, donde se interrumpe la polinización cruzada (Philbrick y Les, 1996).

Finalmente es posible afirmar que en *M. schiedeanum*, el grano de polen al momento de la antesis y dehiscencia de la antera posee solamente dos núcleos, el de la célula vegetativa y el de la célula generatriz; y aún después de germinar en el estigma y después de cuatro horas de crecimiento del tubo polínico aún dentro de la zona del estigma, persisten los mismos dos núcleos. Es posible que el núcleo de la célula generatriz no pase por un proceso mitótico, de ser así, dicho núcleo sería el único disponible para fusionarse con el núcleo de la ovocélula y formar el embrión, de esta manera no existiría una triple fusión entre los núcleos polares de la célula central y un segundo núcleo espermático que no existe, puesto que así se observó en un fragmento del tubo y en la cercanía del óvulo.

Para dar solución al cuestionamiento de la falta de endospermo, al menos en esta especie de la familia Podostemaceae, son necesarios más estudios. Un acercamiento al problema podrían ser los ensayos de inmunolocalización, efectuados en flores autopolinizadas con tiempos superiores a las doce horas post-polinización, que es el tiempo en el que los tubos polínicos se encuentran en la placenta.

CONCLUSIONES

- a) Los órganos sexuales en *Marathrum schiedeanum* se forman en el interior del cuerpo vegetativo de la planta cuando se encuentra sumergida; la pared de la antera inmadura posee epidermis, endotecio, una capa media y tapete.

- b) Las anteras son tetrasporangiadas con un porcentaje muy bajo de aquellas que presentan cinco esporangios (este último atrófico). Hay también un porcentaje muy bajo de anteras que presentan tres microsporangios con polen abortivo.
- c) Los granos de polen se dispersan en mónadas bicelulares.
- d) La germinación abundante de los tubos polínicos se da dentro de un periodo de 5 a 7 horas posteriores a la polinización; se observó su recorrido por el estigma sésil hasta la placenta en un tiempo aproximado de 12 horas.
- e) Mediante inmunocitoquímica se detectó la presencia del tubo polínico y mediante tinción del DNA, dos núcleos, durante las cuatro primeras horas posteriores a la polinización y aún dentro del tejido estigmático. Dichos núcleos corresponden al de la célula vegetativa y la célula generatriz.
- f) No se observó la presencia de tres núcleos en el interior de los tubos polínicos con ninguna de las técnicas empleadas, en su recorrido hasta la zona de placentación.
- g) Por el tipo y cantidad de tubos polínicos observados, en las flores con los distintos tratamientos, se puede afirmar que el sistema de reproducción de *M. schiedeanum* es mixto, prevaleciendo la autogamia sobre la alogamia.
- h) No es posible apoyar ni refutar ninguna de las hipótesis propuestas en la presente investigación.

Los resultados de esta investigación aún no permiten responder cuál es la razón por la que en la familia Podostemaceae no se forma el endospermo, por lo menos con respecto al número de núcleos en el tubo polínico.

En el resumen de una investigación presentado recientemente por Sehgal *et al.* (2010) se da una explicación a la ausencia de doble fecundación en *Dalzellia zeylanica* (Podostemoideae)

La familia Podostemaceae posee características que reafirman su posición entre las angiospermas; su diagnóstico la vuelve una familia singular cuyo estudio requiere enfoques multidisciplinarios. En México el estudio de dicha familia aún tiene mucho por delante en el área de la taxonomía, fisiología, anatomía, genética, ecología y embriología.

BIBLIOGRAFÍA

- Ao Ch., L. Wang, L. Liang y X. Wang. 2009. Anther wall formation, microsporogenesis and male gametogenesis of four closely related species in Astereae (Asteraceae): description, comparison and systematic implications. *Nordic Journal of Botany*. **27**: 292-297.
- Arber A. 1920. *Water plants: A study of aquatic angiosperms*. Cambridge University Press. Cambridge. 436pp.
- Arekal G. y C. Nagendran. 1975. Is there a *Podostemum* type of embryo sac in the genus *Farmeria*? *Caryologia*. **28**:229-235.
- Audran J. 1981. Microspores, pollen grains and tapetum development in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaceae): spore origin of the exinic sporopollenin in cycads. *Review Palaeobotany Palynology* **33**:315-346. En: Furness C., Rudall P. y F. Sampson. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*. **163**: 235–260.
- Baird A. 1939. A contribution to the life history of *Macrozamia reidleyi*. *Journal of the Royal Society of Western Australia*. **25**:153-175. En: Furness C., Rudall P. y F. Sampson. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*. **163**: 235–260.
- Baskorowati L., M. Moncur, S. Cunningham, J. Doran y J. Kanowski. 2010. Reproductive biology of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) 2. Incompatibility and pollen transfer in relation to the breeding system. *Australian Journal of Botany*. **58**: 384-391.

- Battaglia E. 1980. Embryological questions: Is the endosperm of Angiosperms sporophytic or gametophytic? *Annals of Botany* .**39**: 9-30.
- Batygina T. 2002. Embryology of flowering plants. Terminology and Concepts. 1 vol. Science Publishers. USA.
- Batygina T. 2006. Embryology of flowering plants. Terminology and Concepts. 2 vol. Science Publishers. USA.
- Blackmore S. y S. Barnes. 1995. Garside's rule and the microspore tetrads of *Grevillea rosmarinifolia* A. Cunningham and *Dyandra polycephala* Benthham (Proteaceae). *Review Palaeobotany Palynology*. **85**: 111-121. En: Furness C., Rudall P. y F. Sampson. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*. **163**: 235-260.
- Brown R. y B. Lemmon. 1991. Pollen development in orchids. Cytoskeleton and the control of division plane in irregular patterns of cytokinesis. *Protoplasma*. **136**: 9-18.
- Chopra R. y A. Mukkada. 1966. Gametogenesis y pseudo-embryo sac in *Indotristicha ramossisima* (Wight) Van Royen. *Phytomorphology*.**16**: 182-188.
- Coan A., M. Rosa y V. Scatena. 2007. Contribution to the embryology of *Leiothrix fluitans* (Eriocaulaceae: Poales). *Aquatic Botany* **87**: 155–160.
- Cook C. 1990. *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publishing. Holanda. 228pp.
- Cook C. y R. Rutishauser. 2007. Podostemaceae. Kubitzki's "Families and genera of vascular Plants". Springer. **9**: 304-344.
- Crane P. 1985. Phylogenetic analysis of seed plants and the origin of angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **72**: 716-793.
- Crane P., E. Friis y K. Pedersen.1995. The origin and early diversification of Angiosperms. *Nature*. **2**: 27-33.

- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. With a new foreword by Armen Takhtajan. Columbia University Press. USA.
- Davis G. 1966. Systematic embryology of the Angiosperms. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- De Sa´-Haiad B., C. Torres, V. de Abreu, M. Gonçalves, C. Mendonça, L. de Santiago-Fernandes, C. Bove y V. Gonçalves-Esteves. 2010. Floral structure and palynology of *Podostemum weddellianum* (Podostemaceae: Malpighiales). Plant Systematics and Evolution. **290**: 141–149.
- Derksen J., T. Rutten, T. Van Amstel, A. De Win, F. Doris y M. Steer. 1995. Regulation of pollen tube growth. Acta Botanica Neerlandica. **44**: 93-119. En: Batygina T. 2006. Embryology of flowering plants. Terminology and Concepts. 2 vol. Science Publishers. USA.
- Dickinson H. 1982. The development of pollen. Revue de cytology et de Biologie Végétales, Botanique. **5**: 5-19.
- Doyle J. y M. Donoghue. 1986. Seed plant phylogeny and the origin of the angiosperms: an experimental cladistic approach. The Botanical Review. **52**: 321-431.
- Dumas C., R. Knox C. McConchie y S. Russell. 1984. Emerging physiological concepts in fertilization. What's New Plant Physiology. **15**: 17-20.
- Friedman E. 2001. Comparative embryology of basal angiosperms. Current Opinion in Plant Biology. **4**:14-20.
- Furness C., P. Rudall y F. Sampson. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. International Journal of Plant Sciences. **163**: 235–260.
- Furness C. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. Annals of Botany. **84**: 475-499.
- González F., P. Rudall y C. Furness. 2001. Microsporogenesis and systematic of Aristolochiaceae. Botanical Journal of the Linnean Society. **137**: 221-242.

- Gotelli M., A. Scambato, B. Galati y R. Kiesling. 2009. Pollen development and morphology in four species of *Pterocactus* (Cactaceae). *Annales Botanici Fennici*. **46**: 409-415.
- Heslop-Harrison J. 1979a. Aspects of the structure, cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereal* L.). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Suppl. 1, **44**: 1-47. En: Batygina T. 2006. *Embryology of flowering plants. Terminology and Concepts*. 2 vol. Science Publishers. USA.
- Heslop-Harrison J. 1979b. Pollen walls as adaptative systems. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **66**(4): 813-829. En: Batygina T. 2006. *Embryology of flowering plants. Terminology and Concepts*. 2 vol. Science Publishers. USA.
- Jäger-Zürn I. 1967. Embryologische Untersuchungen an vier Podostemaceen. *Österreichische Botanische Zeitschrift* **114**: 10–45. En: Jäger-Zürn I., A. Novelo y C. Philbrick. 2005. Microspore development in Podostemaceae-Podostemoideae, with implications on the characterization of the subfamilies. *Plant Systemtics and Evolution*. **256**: 209-216.
- Jäger-Zürn I. 1997. Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichoideae). *Aquatic Botany*. **57**: 151-182.
- Jäger-Zürn I. 1999. Developmental morphology of the shoot system of *Podostemum subulatum* (Podostemaceae, Podostemoideae). Part V of the series 'Morphology of Podostemaceae' *Beiträge zur Biologie einiger geokarper Pflanzen*. **71**: 281-334.
- Jäger-Zürn I., A. Novelo y C. Philbrick. 2005. Microspore development in Podostemaceae-Podostemoideae, with implications on the characterization of the subfamilies. *Plant Systemtics and Evolution*. **256**: 209-216.
- Johri B., K. Ambegaokar y P. Srivastava. 1992. *Comparative embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag. New York.

- Kapil R. 1970. Podostemaceae. Bulletin of the Indian National Science Academy. **41**: 104-109. En: Murguía-Sánchez G. 2003. Embriología Comparada de los Géneros de la Familia Podostemaceae en México. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 125pp.
- Kaufman E. y K. Rumpunen. 2002. Pollination, pollen tube growth and fertilization in *Chaenomeles japonica* (Japanese quince). Scientia Horticulturae. **94**: 257–271.
- Khosla Ch. y A. Sehgal. 2009. Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae: Tristichoideae). Aquatic Botany. **91**: 51-56.
- Khosla Ch., K. Shivana y H. Mohan Ram. 2000. Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). Aquatic Botany. **67**(2): 143-154.
- Kita Y. y M. Kato. 2001. Intrafamilial phylogeny of the aquatic angiosperms Podostemaceae inferred from the nucleotide sequences of the *matK* gene. Plant Biology. **3**: 156-163.
- Konar R. y H. Linskens. 1966. Physiology and biochemistry of the stigmatic fluid of *Petunia hybrida*. Planta. **71**: 372-387.
- Korotkova N., J. Schneider, D. Quandt, A. Worberg, G. Zizka y T. Borsch. 2009. Phylogeny of the eudicot order Malpighiales: analysis of a recalcitrant clade with sequences of the petD group II intron. Plant Systematics and Evolution. **282**:201–228.
- Kreunen S. y J. Osborn. 1999. Pollen and anther development in *Nelumbo* (Nelumbonaceae). American Journal of Botany. **86**:1662-1676.
- Les D., C. Philbrick y A. Novelo. 1997. The phylogenetic position of riverweeds (Podostemaceae): Insights from *rbcL* sequence data. Aquatic Botany. **57**: 5-27.
- Li F., Ch. Sumei, Ch. Fadi, N. Teng, W. Fang, F. Zhang y Y. Deng. 2010. Anther wall development, microsporogenesis and microgametogenesis in male fertile and sterile chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat., Asteraceae). Scientia Horticulturae.

- López M., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. 2°ed. Las prensas de ciencias, facultad de ciencias, UNAM. México.
- Luna-Ramos R. 2006. Polinización cruzada entre dos especies del género *Marathrum* (Podostemaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 44pp.
- Luna-Ramos R. 2010. Barreras reproductivas entre dos especies del género *Marathrum* (Podostemaceae). Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 129pp.
- Magnus W. 1913. Die atypische embryonalentwicklung der Podostemaceen. Flora. **105**: 275-336. En: Murguía-Sánchez G. 2003. Embriología Comparada de los Géneros de la Familia Podostemaceae en México. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 125pp.
- Magnus W. y E. Werner. 1913. Die atypische embryonalentwicklung der Podostemaceen. Flora. **105**: 276–336. En: Jäger-Zürn I., A. Novelo y C. Philbrick. 2005. Microspore development in Podostemaceae-Podostemoideae, with implications on the characterization of the subfamilies. Plant Systematics and Evolution. **256**: 209-216.
- Maheshwari P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. 1° ed. McGraw Hill. USA.
- Mohan Ram H. y A. Sehgal. 1997. In vitro studies on development morphology of Indian Podostemaceae. Aquatic Botany. **57**: 97-132.
- Mohan Ram H. y A. Sehgal. 2001. Biology of indian Podostemaceae. P. 365-391. En: Rangaswamy N. S. (ed.): Phytomorphology Golden Jubilee Issue 2001: Trends in Plant Sciences. New Delhi.
- Mukkada A. 1964. An addition to the bisporic embryo sacs - The *Dicrea* type. New Phytologist. **63**: 289-292.

- Mukkada A. 1969. Some aspects of the morphology, embryology and biology on *Terniola zeylanica* (Gardner) Tulasne. *New Phytologist*. **68**: 1145-1158.
- Murguía-Sánchez G. 2003. Embriología Comparada de los Géneros de la Familia Podostemaceae en México. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 125pp.
- Murguía-Sánchez G., A. Novelo, C. Philbrick y J. Márquez. 2001. Desarrollo de los verticilos sexuales de *Vanroyenella plumosa* Novelo & Philbrick (Podostemaceae). *Acta Botánica Mexicana*. **57**: 37-50.
- Nagendran C., G. Arekal y K. Subramanyan. 1977. Embryo sac studies in three species of *Polypleurum* (Podostemaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **128**:215-226.
- O'Neill S., J. Osborn, C. Philbrick y A. Novelo. 1997. Comparative pollen morphology of five New World genera of Podostemaceae. *Aquatic Botany*. **57**: 133–150.
- Osborn J., O'Neill S. y G. El-Ghazaly. 2000. Pollen morphology and ultrastructure of *Marathrum schiedeanum* (Podostemaceae). *Grana* **39**: 221–225.
- Pacini E. 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sex Plant Reproduction*. **9**:362–366.
- Palser B. 1975. The bases of angiosperms phylogeny: Embriology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **62**: 621-646.
- Philbrick C. y A. Novelo. 1994. Seed germination of mexican Podostemaceae. *Aquatic Botany*. **48**: 145 – 151.
- Philbrick C. y A. Novelo. 1995. New World Podostemaceae:Ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia*. **47**: 210 – 222.
- Philbrick C. y A. Novelo. 1997a. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. *Aquatic Botany*. **57**: 275-303.

- Philbrick C. y A. Novelo. 1997b. Ovule number, seed number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquatic Botany*. **57**: 183 – 200.
- Philbrick C. y A. Novelo. 1998. Floral phenology, pollen flow and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany*. **57**: 183 – 200.
- Philbrick C. y D. Les. 1996. Evolution of aquatic angiosperms reproductive systems. *Bio Science*. **46**: 813 – 826.
- Philbrick C., A. Novelo y B. Irgang. 2004. Two new genera of Podostemaceae from the State of Minas Gerais, Brazil. *Systematic Botany*. **29**: 109-117. En: Jäger-Zürn I., A. Novelo y C. Philbrick. 2005. Microspore development in Podostemaceae-Podostemoideae, with implications on the characterization of the subfamilies. *Plant Systematics and Evolution*. **256**: 209-216.
- Raghavan V. 1997. *Molecular embryology of flowering plants*. Cambridge University Press. USA. 690pp.
- Razi B. 1949. Embryological studies of two members of the Podostemaceae. *Bot. Gaz.* **3**: 211-218. En: Jäger-Zürn I., A. Novelo y C. Philbrick. 2005. Microspore development in Podostemaceae-Podostemoideae, with implications on the characterization of the subfamilies. *Plant Systematics and Evolution*. **256**: 209-216.
- Razi B. 1955. Some aspects of the embryology of *Zeylanidium olivaceum* (Tid.) Engl. and *Lawia zeylanica* Tul. *Bulletin of the Botanical Society of Bengal*. **9**: 36-41.
- Rudall P. 2000. The pollen of *Takhtajania perrieri* (Winteraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **87**: 380-388.
- Rudall P., C. Furness, W. Chase y M. Fay. 1997. Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Lilianaes). *Canadian Journal of Botany*. **75**: 408-430.
- Schnell R. 1967. Etudes sur l'anatomie et la morphologie des Podostémacées. *Candollea*, **22**: 157-225.

- Sculthorpe C. 1967. The Biology of aquatic vascular plants. Edward Arnold. Londres. 610pp.
- Segal A., H. Mohan Ram y J. Bhatt. 1993. In vitro germination, growth, morphogenesis and flowering of an aquatic angiosperms, *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). Aquatic Botany. **45**: 269-283.
- Segal A., J. Khurana, M. Sethi y H. Ara. 2010. Occurrence of unique three-celled megagametophyte and single fertilization in an aquatic angiosperm-*Dalzellia zeylanica* (Podostemaceae-Tristichoideae). Sexual Plant Reproduction. (en prensa).
- Sheldon J. y H. Dickinson. 1986. Pollen wall formation in *Lilium*: the effect of chaotropic agents, and the organisation of the microtubular cytoskeleton during pattern development. Planta **168**:11-23.
- Shivanna K. 2003. Pollen biology and biotechnology. Science Publishers. India. 301pp.
- Shivanna K., Y. Heslop-Harrison y S. Heslop-Harrison. 1978. Inhibition of the pollen-tube in the self- incompatibility response of grasses. Incompatibility Newsletter, **10**: 5-7.
- Shuraki Y. y M. Sedgley. 1997. Pollen Tube Pathway and Stimulation of Embryo Sac Development in *Pistacia vera* (Anacardiaceae). Annals of Botany 79: 361-369.
- Takhtajan A. 1997. Diversity and Classification of flowering plants. Columbia University Press. New York.
- Tímár I., Z. Kristóf y B. Barnabás. 1997. Comparative studies on the male and female gametophyte development in three different *Triticum* species. Plant Science. **126**: 97-104.
- Tobe H. 1989. The embryology of Angiosperms: Its broad application to systematic and evolutionary study. Botanical Magazine Tokyo. **102**: 351-367.
- Warming E. 1882. Familien Podostemaceae II Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter **6**: 78-130. En: Jäger-Zürn I. 1997. Embryological and floral studies in

Weddellina squamulosa Tul. (Podostemaceae, Tristichoideae). Aquatic Botany. **57**: 151-182.

- Went F. 1908. The development of the ovule, embryo sac and egg in Podostemaceae. Recueil des travaux botaniques néerlandais. **5**: 1-16.
- Zhang D., L. Zhuo y X. Shen. 2010. Sporogenesis and gametogenesis in *Agapanthus praecox* Willd. orientalis (Leighton) Leighton and their systematic implications. Plant Systematics and Evolution **288**:1–11.

ANEXO

Amortiguador de fosfatos pH 7.3 1X

NaCl 137mM, KCl 207mM, NaH₂PO₄ 7H₂O 10mM, Na₂HPO₄ H₂O 2mM

Azul de toluidina (0.5%)

Azul de toluidina 1g

Tetraborato de sodio 1g

Agua destilada 200mL

Azul de anilina

1g/L de azul de anilina en K₃PO₄ 0.1M

Solución de bloqueo (por cada mL se solución de bloqueo)

100µL de suero de cabra (Fetal Bovine Serum, Invitrogen)

100µL de PBS 10X

800µL de agua