



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

APOMIXIS EN *Thalassia testudinum*
BANKS EX KÖNIG
(HYDROCHARITACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LEÓN FELIPE GONZÁLEZ MORALES



DIRECTORA DE TESIS:
Dra. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ
GUZMÁN

CO-TUTORA:
Dra. BRIGITTA INE VAN TUSSENBROEK
RIBBINK

MÉXICO, D.F. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	7
<i>REPRODUCCIÓN ASEXUAL</i>	7
<i>REPRODUCCIÓN SEXUAL</i>	8
APOMIXIS.....	12
<i>APOMIXIS ESPOROFÍTICA</i>	15
<i>APOMIXIS GAMETOFÍTICA</i>	15
TAXONOMÍA.....	15
VENTAJAS EVOLUTIVAS.....	16
TEORÍAS DEL SURGIMIENTO GENÉTICO DE LA APOMIXIS.....	18
LA APOMIXIS Y LOS PASTOS MARINOS.....	19
HIPOTESIS	22
OBJETIVO	22
MATERIAL Y MÉTODO	23
ÁREA DE ESTUDIO.....	23
MARCAJE.....	24
TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.....	25
<i>PRIMER TRATAMIENTO (ABLACIÓN)</i>	25
<i>SEGUNDO TRATAMIENTO (MEMBRANA)</i>	26
.....	28
.....	28
CONTROL.....	28
RECOLECTA.....	29
RESULTADOS	35
RECOLECTAS 2007 Y 2008.....	35
<i>CONTROL</i>	35
<i>EXPERIMENTAL MEMBRANA</i>	36
RECOLECTA DEL 2009.....	38
<i>CONTROL</i>	38
<i>EXPERIMENTAL MEMBRANA</i>	39
MESOCOSMOS.....	43
OBSERVACIÓN DE TUBOS POLÍNICOS POR MEDIO DE FLUORESCENCIA.....	43
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO	54

RESUMEN

Thalassia testudinum (Hydrocharitaceae) es una angiosperma marina. En México se encuentra en estuarios, marismas, lagunas costeras y en zonas someras más abiertas de la costa. Los pastos marinos incluyendo a *Thalassia testudinum*, son productores primarios dentro de los ecosistemas marinos y su conservación es de gran importancia para el manejo exitoso de estos ecosistemas. Por lo tanto es necesario estudiar cómo se reproducen. Se sabe que en la mayoría de los pastos marinos gran parte de su reproducción es asexual, mediante la producción de brotes a partir de tallos subterráneos. Sin embargo, recientemente se sugirió la presencia de otro proceso asexual como es la apomixis (producción de semillas sin fecundación) por Jiménez-Durán (2004). La presente investigación tuvo como propósito documentar la presencia de apomixis en *T. testudinum* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo.

Se diseñaron experimentos en campo para corroborar la presencia de apomixis. Se obtuvieron semillas en la gran mayoría de las flores experimentales trabajadas, sugiriendo la presencia de apomixis en esta especie, sin embargo, esta evidencia de apomixis no es concluyente hasta que se realicen estudios genéticos.

La presencia de apomixis es un mecanismo para la producción de semillas, aun cuando haya limitación por polen o ausencia del mismo, lo que constituye una utilización más eficiente de los recursos para la planta. Además semillas apomícticas pueden funcionar como un vector para el flujo génico entre poblaciones, así como también puede tener un gran valor ecológico al fungir como una estrategia evolutiva de estabilización, ya que tiene la posibilidad de conservar el genotipo "exitoso" de la planta madre sin comprometerlo a mutaciones somáticas, debido a que estas son comunes en organismos tan longevos como los pastos marinos.

INTRODUCCIÓN

Las angiospermas acuáticas representan sólo el 17% del total de las familias de angiospermas y sólo el 1.5% de los géneros totales. Lo que significa menos del 2% del total de las especies de angiospermas (Cook, 1990). Los pastos marinos son angiospermas acuáticas restringidas al ambiente marino. Son semejantes a los pastos terrestres (Poaceae) en la forma general de las hojas y la forma de crecimiento clonal, pero no tienen relación taxonómica alguna.

Según Arber (1920, en Kuo & den Hartog, 2000) una angiosperma se clasifica como pasto marino sólo si cumple con las siguientes cuatro características básicas: 1) adaptación al medio salino, 2) capacidad para desarrollarse estando completamente sumergida, 3) poseer un sistema de anclaje adecuado y 4) polinización hidrófila. Posteriormente den Hartog (1970, en Ackerman, 2006) introdujo una quinta, 5) la necesidad de dispersarse en el contexto marino.

Los pastos marinos son plantas que forman un grupo ecológico y no taxonómico, lo que implica que las familias que lo conforman no necesariamente tienen una relación filogenética cercana (Cook, 1990; Ackerman, 2006).

Todos los pastos marinos están dentro del superorden Alismatiflorae y la subclase Alismatidae, los pastos marinos tienen un origen polifilético que puede ser trazado en tres clados genéticos (Waycott & Les, 2000). Este grupo ecológico se encuentra conformado aproximadamente por 60 especies agrupadas en cuatro familias Zosteraceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae e Hydrocharitaceae (Kuo & den Hartog, 2000). Otros autores (Green & Short, 2003; den Hartog & Kuo, 2006) también incluyen algunas de las especies de las familias Ruppiaceae y Zanichelliaceae.

En nuestro país podemos encontrar a cuatro familias (Zosteraceae, Cymodoceaceae, Hydrocharitaceae, Ruppiaceae), siete géneros (*Zostera*, *Phyllospadix*, *Thalassia*, *Halodule*, *Syringodium*, *Halophila*, *Ruppia*) y diez especies (*Zostera marina*, *Phyllospadix scouleri*, *Phyllospadix torreyi*, *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii*, *Halodule beaudettei*, *Syringodium filiforme*, *Halophila decipiens*, *Halophila engelmanni*, *Ruppia maritima*). En México los pastos marinos se distribuyen en estuarios, marismas, lagunas costeras y en zonas someras de la costa (Lot *et al.*, 1999).

Las comunidades de pastos marinos proporcionan estabilidad y retienen el sedimento aún en condiciones de tormenta o huracanes, proporcionando protección a las playas, gracias al sistema de anclaje que poseen. Además, las hojas y estructuras que sobresalen del sustrato retardan y aminoran las corrientes y olas, incrementando la sedimentación. También funcionan como áreas de crianza para juveniles de peces, crustáceos y moluscos en gran cantidad, muchas de estas especies son de importancia comercial (Heck *et al.*, 2003). En los últimos años se ha documentado la pérdida de 33,000km² de praderas de pasto marino, tan sólo debido al impacto directo de la actividad humana (Walker *et al.*, 2006). Es por demás evidente que la pérdida de estos ecosistemas no sólo involucrará la pérdida de los pastos, si no la de muchas otras especies que dependen de estos. La conservación de estos ecosistemas es de vital importancia y para lograrlo debemos comprender la biología de estas especies. El objeto de este estudio, *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) se encuentra ampliamente distribuida en el oeste del océano Atlántico desde Florida hasta Venezuela (Green & Short, 2003). En México se localiza en Campeche, Quintana Roo, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Lot *et al.*, 1999). Esta especie se desarrolla en zonas de marea baja y hasta los diez metros de profundidad, crece en sitios protegidos de la marea y sobre un sustrato lodoso o arenoso (Phillips & Meñez, 1988). Se sabe que esta especie mantiene sus

poblaciones principalmente a través de la extensión de los rizomas (crecimiento clonal, van Tussenbroek *et al.*, 2006) y que la reproducción sexual juega un papel importante en mantener el flujo génico entre las poblaciones (van Dijk *et al.*, 2009) así como también mantiene la diversidad genética dentro de las poblaciones (van Dijk & van Tussenbroek, 2010), pero no se ha publicado ningún trabajo que confirme la presencia de apomixis en esta especie. La apomixis, se sugirió como una posible explicación en un análisis genético de *Halophila* (McMillan & Williams, 1980; York *et al.*, 2008). Jiménez-Durán, (2004), realizó un estudio sobre el desarrollo y dispersión de frutos y semillas de *Thalassia testudinum* y en algunas muestras observó sacos embrionarios múltiples que pudieran estar relacionados al desarrollo de embriones adventicios apomícticos. Los datos no fueron concluyentes, pero sugirieron la presencia de apomixis en *Thalassia testudinum*.

ANTECEDENTES

REPRODUCCIÓN ASEXUAL

La reproducción de los pastos marinos puede ser tanto sexual como asexual. Según Hutchinson (1975) la mayor parte de la reproducción de las hidrófitas es asexual y como resultado de esto, grandes poblaciones clonales son comunes en estas plantas incluyendo a las marinas. La reproducción asexual de los pastos marinos se da a partir del crecimiento vegetativo de los rizomas a través del fondo marino, dando origen a nuevos módulos clonales, los nuevos individuos genéticamente iguales son llamados rametos. A los individuos provenientes de la reproducción sexual se les llama genetos. La expansión vegetativa a través de los rizomas es una característica que comparten estas plantas con alrededor del 70% de las especies de la subclase Alismatidae y con alrededor del 10% de todas las familias de Angiospermas (Grace, 1993). En los pastos marinos, distinguir un individuo de otro es muy difícil ya que los rizomas forman una trama imposible de seguir y las conexiones de estos se pierden con el tiempo (van Dijk & van Tussenbroek, 2010). Anteriormente, se pensaba que la diversidad genética de las poblaciones de pastos marinos era baja debido a la extensión enorme de los rizomas, ya que esta es su principal forma de reproducción, y que por este medio, las praderas lograban alcanzar gran tamaño (Pitelka & Ashmun, 1985). En el caso de *Thalassia testudinum* actualmente se sabe que la diversidad genética en las poblaciones es alta. El promedio del largo de un individuo de *T. testudinum* dependiendo del hábitat, puede ser de entre 6.5m, 10.3m y 167.3m, para la laguna arrecifal, las costas someras y la laguna de manglar, respectivamente (van Dijk & van Tussenbroek, 2010). Esto quiere decir que, *Thalassia testudinum* a pesar de ser una especie perenne tiene muchos especímenes o individuos que provienen de procesos sexuales, contradictorio a la suposición de Hutchinson (1975).

REPRODUCCIÓN SEXUAL

La fecundación de los pastos marinos se da por polinización hidrófila, esto es el uso del agua como vector para el transporte del polen. Según Cox y Knox (1989) existen tres tipos de polinización hidrófila: 1) polen transportado por encima de la superficie del agua, 2) polen transportado en la superficie del agua, 3) polen transportado bajo la superficie del agua (polinización submarina) (Fig. 1). *T. testudinum* tiene el último método de polinización (Cox & Knox 1989).

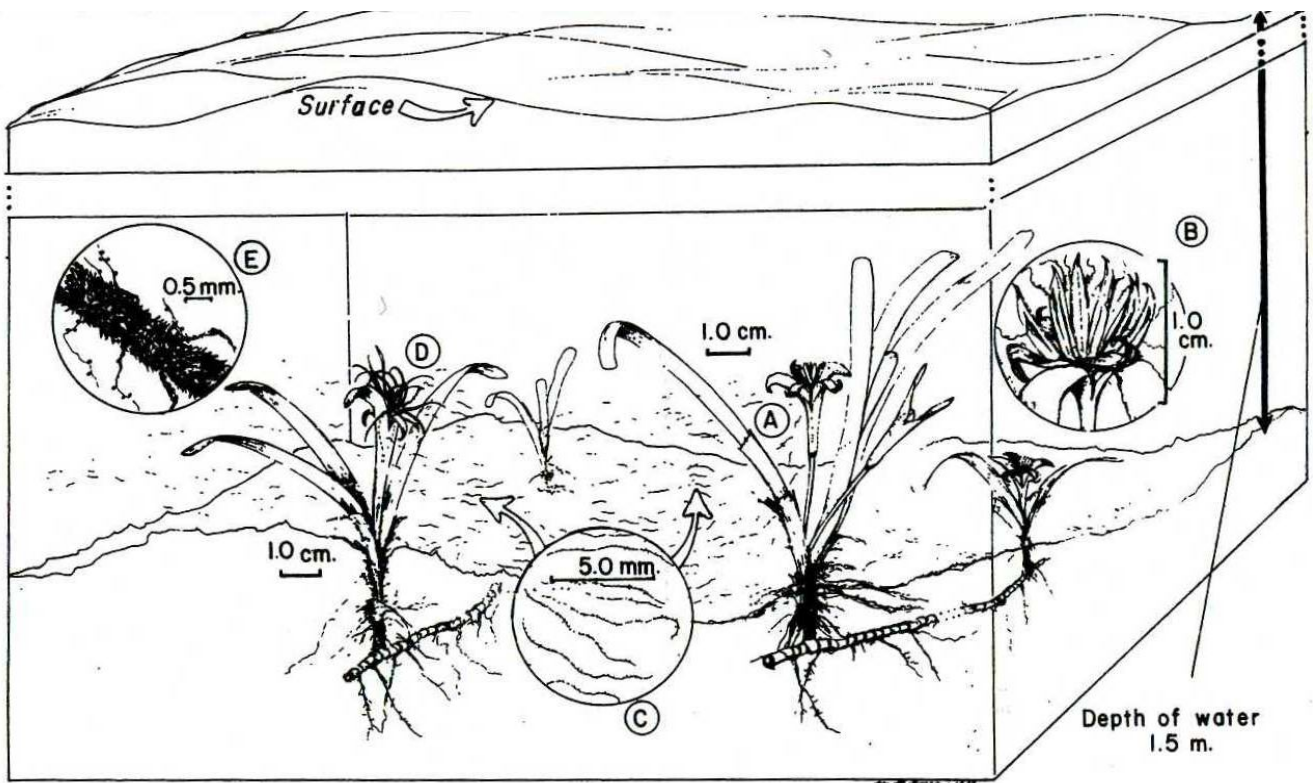


Fig. 1 Categoría 3 Hidrófila (polinización submarina) *Thalassia testudinum*. A.-Flores masculinas. B.- Generación del mucílago. C.- Dispersión submarina del polen embebido en el mucílago. D.- Flor femenina con estigma rígido. E.- Polinización por colisión. Tomado de Cox y Knox, 1989.

Debido a que los pastos marinos tienen una polinización submarina, han desarrollado diversas estrategias para que esta sea más exitosa; las flores masculinas de esta especie sobrepasan el número de flores femeninas, por lo que se produce una gran proporción de granos de polen en relación al número de óvulos (Ackerman, 2006). Otra estrategia recientemente descubierta es la sincronización de la antesis, las flores femeninas abren durante el día, permitiendo que al llegar la noche se encuentren receptivas; durante el ocaso y la noche las flores masculinas abren de forma sincronizada (Fig. 2) y liberan el polen, aumentando de esta forma el éxito de la fecundación, se cree que este fenómeno está regulado por el fotoperiodo (Van Tussenbroek *et al.*, 2008).



Fig. 2 *Thalassia testudinum* Flor masculina durante la noche.

Nueve de los 13 géneros de pastos marinos son plantas dioicas incluyendo a *Thalassia testudinum* (Ackerman, 2006) (Fig. 3).

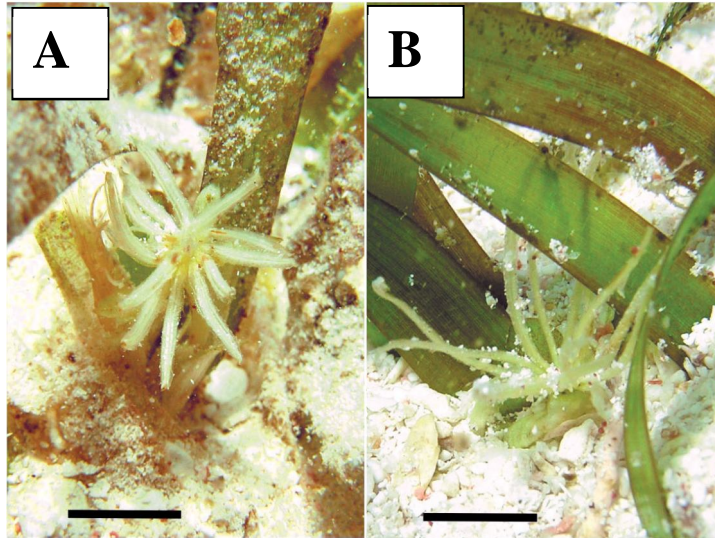


Fig. 3 *Thalassia testudinum*. (A) Flor masculina después de la dehiscencia, (B) Flor femenina después de la dehiscencia. Barra de escala = 1cm. Tomado de Van Tussenbroek *et al.*, 2008.

Las flores masculinas de *Thalassia testudinum* tienen un pedicelo de 1.25-2.5 cm de largo y posee nueve estambres; las flores femeninas tienen un pedúnculo de 3-4 cm de largo y presentan de 7-8 estilos de 1.5-2.5 cm de largo (Phillips & Meñez, 1988), el ovario es ínfero y posee de 1-3 (a veces más) óvulos individuales, los dos morfos tienen tépalos incoloros que a veces presentan manchas de color violeta o morado (Fig. 4; Ourpurt & Boral, 1964).

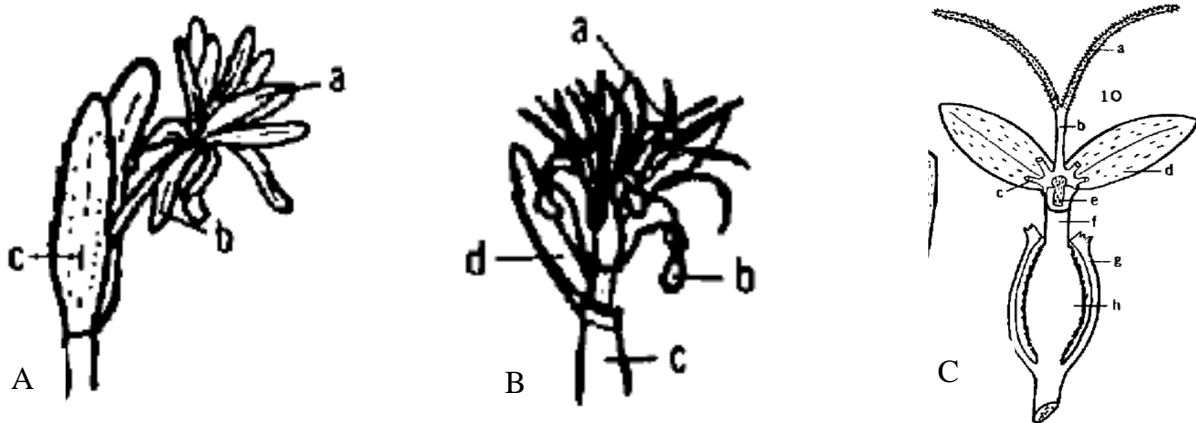


Fig. 4 Esquema de las flores de *Thalassia testudinum* A.- Flor masculina (a) estambres, (b) perianto, (c) bráctea. B.- Flor femenina (a) estigmas, (b) perianto, (c) ovario, (d) bráctea C.- Flor femenina seccionada (a) estigma, (b) estilo, (c) tubo de estilos, (d) segmentos del perianto, (e) centro del tubo del estilo, (f) tubo del estilo, (g) hipantio, (h) ovario. Tomado de Ourpurt & Boral, 1964.

En *Thalassia testudinum*, las flores se encuentran separadas espacialmente de un individuo a otro, por lo tanto es necesario que el polen viaje de una flor a otra, las flores masculinas liberan el polen contenido en las tecas a través de una apertura provocada por la dehiscencia longitudinal (Fig. 5-A), los granos de polen esféricos, de ~50 μm de diámetro están embebidos en una matriz de mucílago (Fig. 5-B) con una flotabilidad negativa. Cuando el mucílago y los granos de polen son liberados, forman conglomerados (Fig. 5-C) que se asemejan a pequeños collares o algodones, estos son desplazados cerca de la superficie del fondo marino gracias a las corrientes, hasta que hacen contacto con las papilas del estigma (Fig. 5-D) de una flor femenina (Cox & Tomlinson, 1988) y comienza el crecimiento de los tubos polínicos.

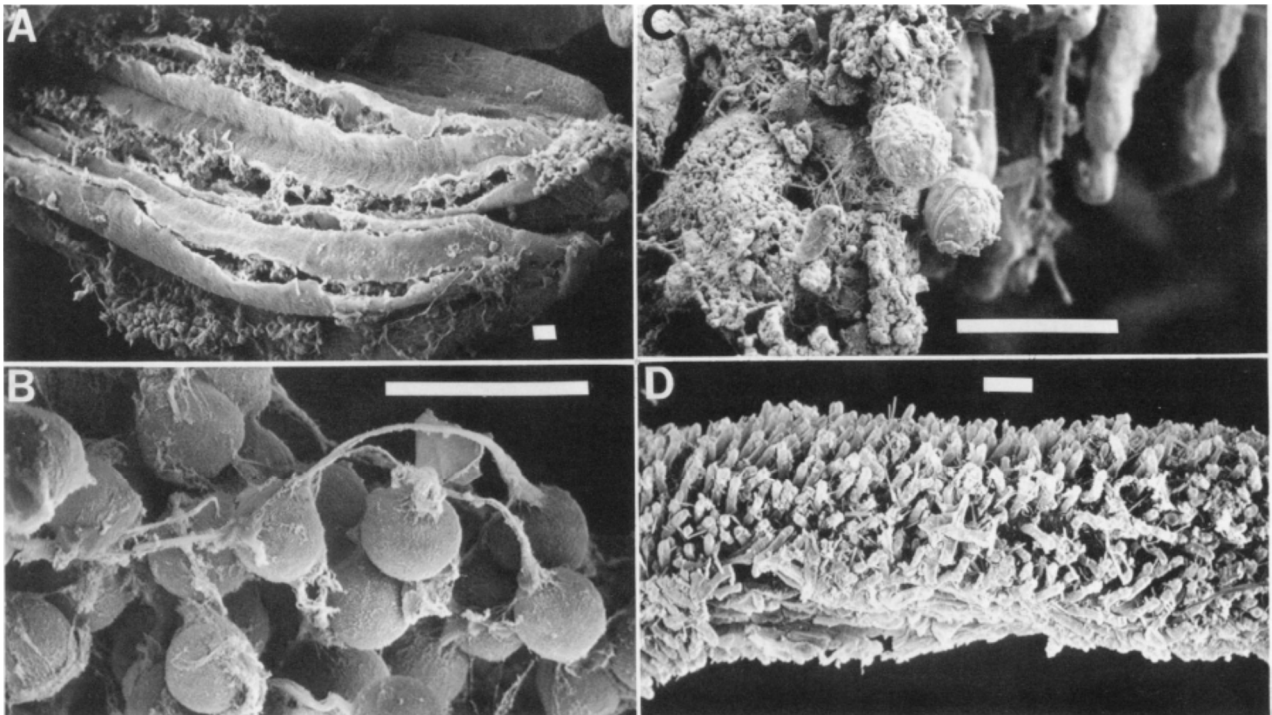


Fig. 5 *Thalassia testudinum* MEB A.- Tecas dehiscentes longitudinalmente B.- Conglomerado de granos de polen unidos por la matriz de mucílago. C.- Conglomerado de granos de polen y mucilago después de la dispersión, depositados en un estigma. D.- Porción lineal de una papila estigmatica. Barra de escala = 100 μm Tomado de (Cox & Tomlinson, 1988).

El fruto de *Thalassia testudinum* tiene una forma globosa y posee una consistencia carnosa, se desarrolla con un color verde intenso pasando por amarillo y a veces hasta el rojo. El fruto puede contener de 1 a 6 semillas pero generalmente son sólo tres. Los frutos maduros pueden abrir y liberar las semillas cuando todavía se encuentran unidos a la planta madre o liberarlas, cuando estos llegan a desprenderse y se encuentran flotando (Ourpurt & Boral, 1964).

Thalassia testudinum tiene reproducción sexual estacional; en el mar del caribe mexicano inicia en febrero con primordios florales, con flores en antesis durante los meses de abril a septiembre (Van Tussenbroek, 1994) y frutos maduros desde julio hasta octubre (Jiménez-Durán, 2004). En la Laguna Madre, Texas, las flores y frutos de *Thalassia testudinum* pueden llegar a representar hasta el 16% de la biomasa total presente por encima del sustrato, valor similar al que se estima para pastos terrestres (Kaldy & Dunton, 2000).

APOMIXIS

La reproducción sexual no es la única forma de producir descendencia a través de las flores, alguna especies de angiospermas pueden producir semillas de manera asexual; a este fenómeno se le conoce como apomixis. Fue descrito por primera vez por Smith, (1841). Winkler (1908; en Bicknell & Koltunow, 2004) introduce el término apomixis para referirse a “la sustitución de la reproducción sexual por un proceso de multiplicación asexual sin la fusión celular y de sus nucleos”. Posteriormente, el término se usó para cualquier forma de reproducción asexual, incluyendo la propagación clonal. La definición actual es mucho más restrictiva, se aplica a los procesos de reproducción asexual que ocurren en el óvulo (Nogler, 1984), sin meiosis y fecundación, que conllevan al desarrollo embrionario (Bicknell

& Koltunow, 2004). Los individuos producto de la apomixis son genéticamente idénticos a la planta madre (Koltunow & Grossniklaus, 2003). La apomixis ha sido observada en 400 especies de plantas que corresponden a 40 familias de angiospermas (Bicknell & Koltunow, 2004). Este fenómeno no se ha reportado en gimnospermas (Mogie, 1992 en Witton *et al.*, 2008).

Algunos autores utilizan agamospermia como sinónimo de apomixis, para este trabajo me referiré únicamente como apomixis al proceso anteriormente descrito.

Existen tres mecanismos apomícticos que ocurren en tres diferentes momentos del desarrollo de los óvulos: diplosporia, aposporia y embrionía adventicia (Asker & Jerling, 1992).

Todos los mecanismos apomícticos poseen tres componentes en común: la generación de una célula para formar un embrión sin pasar por meiosis (apomeiosis); la capacidad espontánea del desarrollo embrionario ya sea dependiente o independiente de la fusión de los núcleos polares (partenogénesis), lo núcleos polares en la reproducción sexual son los que al fusionarse con un núcleo espermático formarán el endospermo; y la capacidad de producir autónomamente endospermo o utilizar el endospermo producto de la fecundación (Koltunow, 1993).

Distintos autores han dividido los mecanismos apomícticos en dos grandes vertientes: Apomixis esporofítica en donde los embriones surgen espontáneamente de células del óvulo (Bicknell & Koltunow, 2004); Apomixis gametofítica en donde los megagametofitos no reducidos (células que no han reducido la ploidía por meiosis) se diferencian en embriones (Whitton, *et al.*, 2008)(Fig. 1). Sin importar que tipo de apomixis se lleve a cabo, se debe dar con un desarrollo independiente del endospermo. Típicamente un endospermo producto de la reproducción sexual es triploide, dos genomas corresponden al materno y uno es de origen paterno (2m: 1p). En la apomixis el desarrollo de endospermo puede ocurrir de varias formas:

1) La célula central es fecundada por un núcleo espermático, a este fenómeno se le conoce como pseudogamia. 2) El endospermo se desarrolla autónomamente sin la necesidad de que la célula central sea fecundada, esto sucede en algunas plantas apomícticas de la familia Asteraceae. 3) En otros casos cuando la proporción de genomas no es cercana a 2m:1p la planta puede producir más de un endospermo para equilibrar la proporción (Ozias, 2006) (Fig. 1).

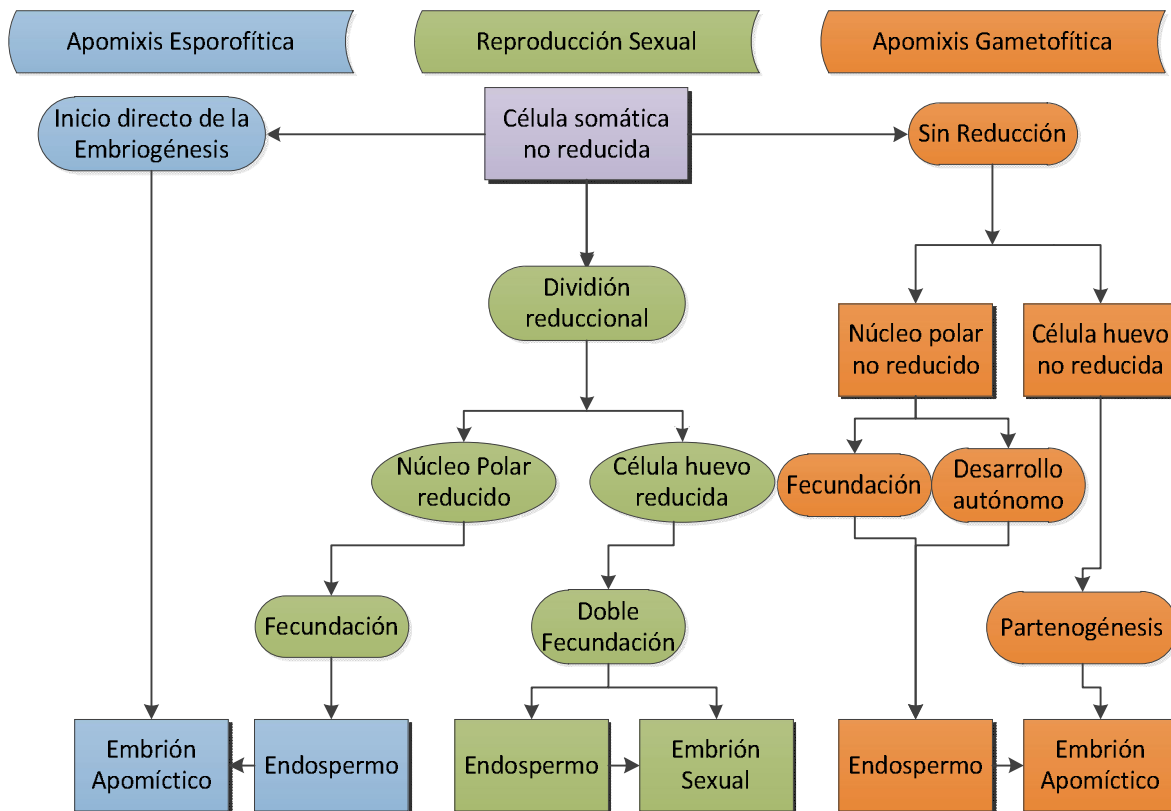


Fig. 1 Principales eventos de la apomixis y su relación con la reproducción sexual. Las células no reducidas se encuentran dentro de rectángulos, las células reducidas están dentro de óvalos y los eventos clave están en negritas.

Los mecanismos gametofíticos son subdivididos dependiendo de la célula que de origen al saco embrionario no reducido: La diplosporía se origina en la célula madre de la megaspora (CMME) u otra célula con el mismo potencial apomíctico, que ocupe la misma posición y que de origen a un saco embrionario no reducido;

La apospórea ocurre cuando una o más células somáticas, también nombradas iniciadoras apospóreas, dan origen a un embrión no reducido (Crane, 2001).

APOMIXIS ESPOROFÍTICA

La embrionía adventicia, puede originarse en dos tejidos diferentes: una célula proveniente de la nucela o por la diferenciación de una célula proveniente del tegumento interno (embriocitos), ambos tipos de embrionía adventicia permiten la existencia de embriones de origen sexual (Crane, 2001).

APOMIXIS GAMETOFÍTICA

La diplosporia puede ser, meiótica o mitótica. En el tipo meiótico, la célula madre de la megaspóra se diferencia de la nucela y comienza la meiosis pero rápidamente es abortada de alguna forma para dar paso a la mitosis que finalmente formará el saco embrionario. En la diplospórea mitótica, que es la más común de estas dos, la célula madre de la megaspóra es inhibida a entrar a meiosis y pasa directamente a mitosis para formar el saco embrionario (Koltunow, 1993).

La apospórea a diferencia de la diplospórea no se inicia con la célula madre de la megaspóra. Se inicia con otra célula proveniente de la nucela y sigue los pasos similares de diferenciación y partenogénesis. Los sacos embrionarios producto de la apospórea pueden convivir con otros sacos productos de la megaspóra dentro del mismo óvulo (Koltunow, 1993).

TAXONOMÍA

Taxonómicamente la apomixis ocurre esporádicamente, entre las 457 familias de angiospermas registradas por la APG (2003). Carman, (1997) enlista más de 330 géneros con apomixis, alrededor de más de dos terceras partes de éstos presentan embrionía adventicia. La frecuencia de la reproducción asexual en los taxa con embrionía adventicia está pobremente documentada. Por otro lado, tres cuartas partes de los 126 géneros conocidos con apomixis gametofítica están presentes en

sólo tres familias Rosaceae, Poaceae y Asteraceae, las cuales sólo comprenden 15% del total de las familias de angiospermas (APG, 2003). Estimar el número de especies apomícticas dentro de las angiospermas es esencial para dar una respuesta a las diferentes opiniones taxonómicas de la naturaleza de este fenómeno.

Los mecanismos apomícticos difieren entre los grupos taxonómicos: algunas especies de las familias Rosaceae y Poaceae son generalmente apospóricas, en cambio las apomícticas de la familia Asteraceae son comúnmente diplospóricas (Whitton *et al.*, 2008). Las especies con embrionía adventicia, con un menor número de reportes en comparación, generalmente pertenecen a las familias Rutaceae, Celastraceae, y Orchidaceae (Naumova, 1993). Sin embargo la embrionía adventicia es común entre los árboles y arbustos tropicales y subtropicales, la apomixis gametofítica ha sido descrita comúnmente entre herbáceas perennes de climas templados (Asker & Jerling, 1992). A pesar de esto no existen suficientes datos para correlacionar los tipos de apomixis con el tipo de crecimiento o la distribución geográfica de las especies. Sin embargo dada la distribución de la apomixis entre los diferentes grupos taxonómicos, se sabe que la apomixis es un fenómeno que ha surgido varias veces entre las angiospermas.

VENTAJAS EVOLUTIVAS

Desde los trabajos de Mendel la reproducción sexual fue reconocida como el pináculo de la evolución de los sistemas de reproducción en las plantas, asociado también a los mecanismos que proveen recombinación genética (meiosis y fecundación). Estos mecanismos crean la reserva de variabilidad heredable para la evolución. Y se potencializan cuando los caracteres heterogéneos se combinan, como en el caso de la reproducción híbrida. Debido a que la apomixis carece de meiosis y recombinación genética, fue considerada durante muchos años, sobre

todo en la década de los 1940's como un callejón evolutivo y como un sistema inevitablemente condenado a la extinción (Gustafsson, 1947). Los organismos apomícticos se consideraban simplemente como numerosas copias de un solo genotipo, sin plasticidad evolutiva y que inevitablemente su adecuación sería superada por otras especies cuando las condiciones ambientales cambiaran. Con el tiempo se hicieron más estudios de plantas apomícticas y se descubrieron nuevos modelos de apomixis (apomícticos facultativos, pseudoapomícticos), pero todavía en la década de 1970's se consideraba a la apomixis como una "casualidad" que no afectaba la adquisición de mayor variabilidad de las especies (Wet & Stalker, 1974: en Batygina, 2009).

Basados en la información acumulada de las últimas décadas Batygina (2009) afirma que el papel evolutivo de la apomixis es diverso y no limitado a la preservación y reproducción de valiosos genotipos. La apomixis facultativa amplía los límites de la recombinación genética al involucrar gametos sin reducción en procesos sexuales.

En los casos en los que existan simultáneamente procesos para la formación de semillas apomícticas y sexuales en la misma planta, la descendencia tendrá diferente constitución genética y diferentes formas de reproducción (sexual y asexual).

Según Campbell & Dickinson, (1990) un individuo es más apto para competir y consecuentemente tendrá mayor oportunidad para preservarse e influenciar el acervo genético de la población, sí combina la reproducción por medio sexual y apomíctico. Además si esto ocurre en muchos individuos de la población se incrementa el flujo de información genética. También la descendencia de individuos con una carga genética no balanceada (como son los haploides, aneuploides, poliploides e híbridos), una vez que se establecen pueden formar las bases para un nuevo genotipo estable. Estas nuevas formas genotípicas por medio

del aislamiento por reproducción apomíctica estable pueden con el tiempo transformarse en nuevas especies.

De acuerdo a un estimado actual, la apomixis ha hecho una contribución significativa a la evolución de las plantas, comparable a la que se ha dado por medio de la amphimixis (formación de un nuevo individuo a través de la unificación de los gametos masculino y femenino). La interacción de amphimixis con la apomixis en el sistema de propagación de las semillas de una misma especie, crea las condiciones más favorables para la evolución progresiva de nuevas especies (Batygina, 2009).

TEORÍAS DEL SURGIMIENTO GENÉTICO DE LA APOMIXIS

El origen de la apomixis se atribuyó durante el Siglo XX a los procesos de hibridación. En 1918 Ernst elaboró la hipótesis de la hibridación interespecífica como origen de la apomixis. Años después se encontraron especies apomícticas autopoliploides (individuos con poliploidías pertenecientes a la misma especie, lo que limita la posibilidad de tener origen híbrido) y se observó que los híbridos hechos por el hombre en los cultivos no generaban plantas apomícticas, con lo cual la hipótesis de Ernst cayó en desuso (Batygina, 2009). La siguiente hipótesis acerca del origen de la apomixis se basó en la mutación heredable, esta idea fue sostenida por diversos autores de gran importancia a finales del siglo XX (Asker & Jerling, 1992, Carman, 1997). Con el tiempo esta hipótesis tuvo dos vertientes, la primera sugirió que los genes apomícticos son recesivos y requieren de entrecruzamientos con poliploidías específicas para su expresión. La segunda hipótesis, dice que los genes apomícticos son dominantes, manipulables, y provienen de mutaciones específicas en genes reguladores de este fenómeno. Como sea este par de hipótesis no toman en cuenta la distribución geográfica de las especies que hasta el momento se han caracterizado como apomícticas. Recientemente se han realizado

estudios en donde se propone que la apomixis es regulada por un trasfondo genético, compuesto por genes duplicados femeninos, involucrados en el desarrollo y que a su vez están independientemente regulados por genes divergentes reguladores (probablemente genes fotosensitivos y termosensibles) (Batygina, 2009).

LA APOMIXIS Y LOS PASTOS MARINOS

El estudio de la apomixis en los pastos marinos es escaso, desde que se comenzó a estudiar la apomixis a principios del siglo XX, no se realizó ningún estudio de apomixis en pastos marinos si no hasta 1980 con el trabajo de McMillan & Williams. El estudio titulado "Systematic implication of isozymes in *Halophila* section *Halophila*" se basó en la recolección de plantas provenientes de diferentes poblaciones alrededor del mundo, Australia, Palau, Guam, Kenia, Florida, St. Croix, y Hawái a lo largo de cuatro años (1976-1980). Se cultivaron individualmente en recipientes de 500 ml en el laboratorio bajo condiciones controladas de salinidad y temperatura. De todas las especies en cultivo, sólo la especie monoica *H. decipiens* (de St. Croix) produjo flores masculinas y femeninas, mientras *H. ovalis* (Palau), *H. minor* (de Guam) produjeron pocas flores femeninas (sin desarrollar frutos o semillas). Ninguna flor fue observada en las especies dioicas *H. ovalis* (de Australia), *H. johnsonii* (de Indian River Lagoon), y *H. hawaiiiana* (de Hawaii) en sus estanques de cultivo, sin embargo, a la especie dioica *H. stipulacea* (de Kenia) se le atribuyó la capacidad apomíctica debido a que durante once meses se registraron numerosos frutos y semillas de esta especie y no se observaron plantas masculinas.

El segundo trabajo que se realizó en este contexto, fue publicado por (York *et al.*, 2008) titulado: Megagametogenesis in *Halophila johnsonii*, a threatened seagrass with no known seeds, and the seed-producing *Halophila decipiens*

(Hydrocharitaceae). Este segundo trabajo intenta identificar si *Halophila johnsonii* es capaz de reproducirse de forma sexual (basados en que sólo se habían registrado flores femeninas de esta especie en el campo). Para lograr este objetivo, York *et al.* (2008) se plantearon el estudio de las primeras etapas de la megasporogénesis, y lo llevaron a cabo con la obtención de cortes de óvulos durante la formación de la tétrada lineal de megasporas. La formación de esta célula puede ser la clave para discernir entre un fenómeno apomítico y uno sexual. Según Asker & Jerling (1992), en las pocas especies de plantas apomíticas, que exhiben diplosporía meiótica o duplicamiento premeiótico a través de la endoreplicación o la endomitosis, las tétradas lineales no se forman. El estudio se basa en la comparación de la megasporogénesis de *Halophila johnsonii* y *Halophila decipiens*, en donde colectaron porciones de rametos, en tres puntos de las costas de Florida, EUA. También realizaron cultivos de parches de estas especies en acuarios dentro del laboratorio. Lograron obtener 50 flores de cada especie y las procesaron en el laboratorio, pero sólo lograron obtener cortes en 20 de las muestras de cada especie, debido a problemas con la disección, con la inclusión, la orientación de los cortes, y los cortes mismos. Encontraron tétradas lineales y por tanto ellos sugieren que se da la formación de una célula huevo haploide (meiosis). Detectaron desarrollo embrionario en la especie monoica *H. decipiens*, sin embargo casi todos los óvulos de *H. johnsonii* también presentaron la tétrada lineal suponiendo entonces que la falta de producción de semillas en esta especie es debido a la falta de plantas masculinas y no por un defecto en el desarrollo del megagametofito. Como conclusión proponen que en presencia de polen debiera haber desarrollo de semillas sexuales de *Halophila johnsonii*.

Analizando, estos dos trabajos podemos apreciar que existe una gran dificultad en el análisis de este fenómeno, ya que la apomixis es un proceso que involucra diferentes etapas del desarrollo, desde la formación del óvulo hasta el desarrollo

de semillas viables. Es difícil que el estudio de una sola etapa de una respuesta concreta. Por otro lado estos dos estudios nos dan la pauta para preguntarnos si este fenómeno pudiera estar presente en otras especies de pastos marinos. Las ventajas evolutivas y reproductivas de este fenómeno sobre los organismos que la poseen no son menospreciables:

- Crea un balance en la variabilidad, para no generar genes nocivos.
- Amplia los límites de la recombinación genética.
- Si la formación de semillas apomícticas y sexuales se da en la misma planta, la descendencia tendrá diferente constitución genética.
- Si la reproducción es apomíctica y sexual en muchos individuos de la población, esto incrementa el flujo de información genética.
- Si una población apomíctica sufre aislamiento por reproducción apomíctica estable, puede, con el tiempo, transformarse en una nueva especie.
- La interacción de amphimixis con la apomixis en el sistema de propagación de las semillas crea las condiciones más favorables para la evolución progresiva de especies.

La razón principal por lo que los estudios de plantas apomícticas están basados casi exclusivamente en plantas de interés agrícola o de interés comercial, es porque la apomixis, puede ser de gran importancia para la agricultura ya que tiene el potencial de preservar los híbridos F_1 y las propiedades de heterocigosis con valor agrícola, a través de muchos años y generaciones. Pero esto no quiere decir que no tenga un valor ecológico enorme.

A través de los últimos años se ha documentado la pérdida de 33,000km² de praderas de pastos marinos, tan sólo debido al impacto directo de la actividad humana (Walker *et al.*, 2006). Es por demás evidente que la pérdida de estos ecosistemas no sólo involucrará la pérdida de los pastos, si no la de muchas otras especies que dependen de estos. La conservación de estos ecosistemas es de vital importancia y para lograrlo debemos comprender la biología de los pastos marinos, si logramos comprender el funcionamiento completo del ciclo reproductivo, en un futuro nos será más fácil lograr un plan de restauración y/o

conservación. En el mar del caribe mexicano y parte del Golfo de México, *Thalassia testudinum* es una de las especies más abundantes de pasto marino.

HIPOTESIS

- Hipótesis Ho: No existe apomixis en la formación de semillas de *Thalassia testudinum*.

- Hipótesis Ha: Sí existe apomixis en la producción de semillas de *Thalassia testudinum*.

OBJETIVO

Objetivo general

- Determinar si hay apomixis en *Thalassia testudinum*.

Objetivo Particular

- Describir el desarrollo de las semillas de flores femeninas de *T. testudinum* cubiertas por membranas de diálisis que eviten la polinización.

- Describir el desarrollo de las semillas de las flores femeninas de *T. testudinum* en las que los estigmas fueron eliminados manualmente.

MATERIAL Y MÉTODO

ÁREA DE ESTUDIO

El sitio de estudio se encuentra en Puerto Morelos, Quintana Roo, México, en la laguna arrecifal que forma parte del Área Natural Protegida Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, localizada en el Caribe Mexicano, en la costa noreste de la Península de Yucatán. El clima es cálido sub-húmedo, principalmente influenciado por los vientos alisios, que transportan masas de aire marítimo tropicales provenientes del Mar Caribe (Merino & Otero, 1991). Estos vientos tienen una dirección predominante sur-este. En el invierno la zona se ve afectada por masas de aire polar, localmente conocidos como "nortes". La Península está ubicada en una zona de alta frecuencia de huracanes. La época principal de afectación es entre junio y noviembre (Ruíz-Rentería *et al.*, 1998). La laguna está delimitada por un arrecife situado entre 350 y 1600 m de distancia de la costa. Este arrecife es de tipo barrera bordeante y corre paralelo a la línea de costa. La laguna tiene una profundidad de 3-6 m y su fondo está cubierto por arena calcárea colonizada por una comunidad de pastos marinos, en la cual domina *T. testudinum*. La laguna se puede dividir en tres zonas principales: costera, laguna media y arrecife posterior. *Thalassia testudinum* comparte la laguna con *Syringodium filiforme*, *Halodule wrightii* y algas rizofíticas (Ruíz-Rentería *et al.*, 1998).

Con la finalidad de facilitar las colectas, se eligió un área de la pradera (arrecife posterior) en la cual el despliegue floral es frecuente. El sitio específico de las colectas se encuentra exactamente en las coordenadas 20°51'854''N, 86°51'492''W (Fig. 7).

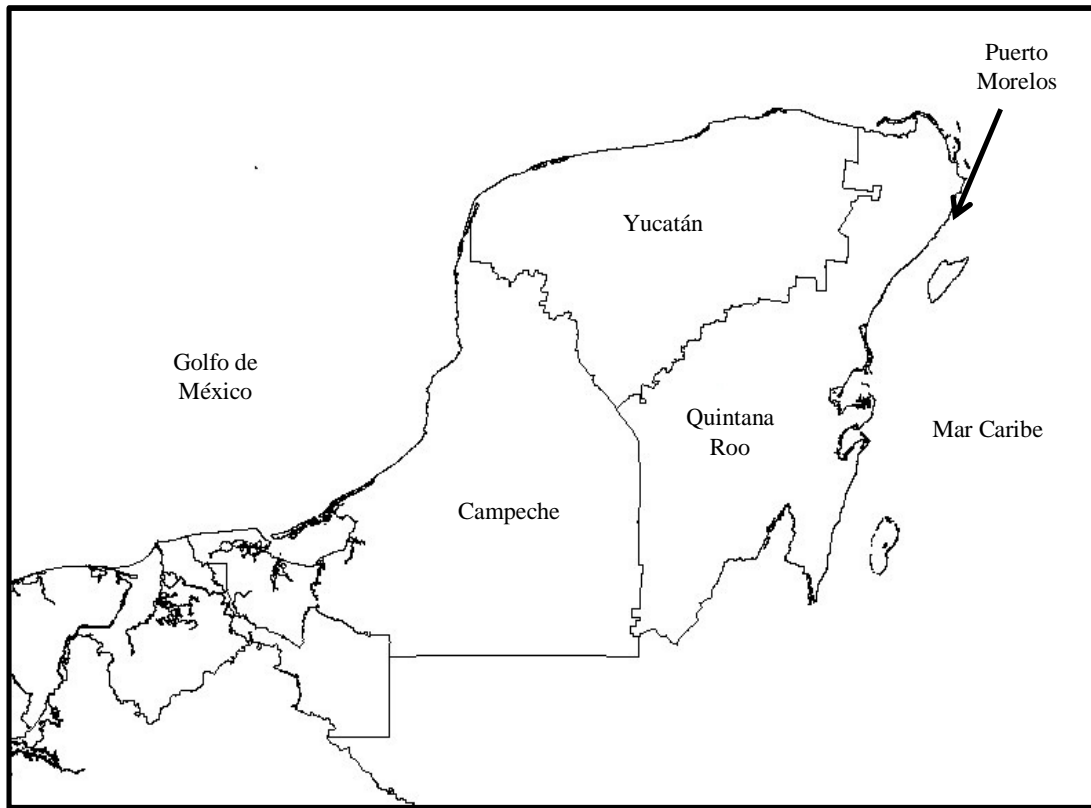


Fig. 7 Mapa del área de estudio, Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

MARCAJE

Se marcaron las flores femeninas con dos estacas hechas de alambre recocido, cubiertas por popotes de plástico grueso. El plástico se utilizó para no contaminar el sustrato o afectar a los pastos con el óxido liberado por el alambre recocido. En la punta de cada estaca se amarró una cinta de plástico de color brillante, para que resaltara y que pudiera ser fácilmente distinguible bajo el mar, la otra punta de la cinta estaba sujeta a un pedazo de corcho con la finalidad de mantenerla a flote y resultara más fácil su localización. Cada cinta tenía su propio código de identificación. Posteriormente se colocó una malla plástica entre las marcas y otra estaca pequeña de plástico para proteger el botón o la flor de la herbivoría (Fig. 8).



Fig. 8. Botón femenino de *T. testudinum* protegido por una malla plástica para evitar la herbivoría por peces.

TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Para este trabajo se diseñaron dos tratamientos experimentales y un control, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de frutos bajo tratamiento (en el caso de que existieran). Las plantas marcadas se revisaron periódicamente *in situ* durante los meses de marzo, abril, mayo y junio del 2009.

PRIMER TRATAMIENTO (ABLACIÓN)

En 2009 (ver ANEXO) se localizaron 50 flores femeninas recién abiertas (ese mismo día) o que estuvieran en el proceso de apertura (Fig. 9-A). A estas flores se le cortaron los estigmas y parte del estilo manualmente, e inmediatamente después se colocó una malla de plástico. Se recolectaron 11 flores a intervalos de 10, 26, 33 y 36 días después de la antesis para su posterior análisis en el laboratorio (Fig. 9-B). A todas las flores sometidas a este tratamiento se les etiquetó como "ablación" y se les representó con una "A" seguido de un número consecutivo.

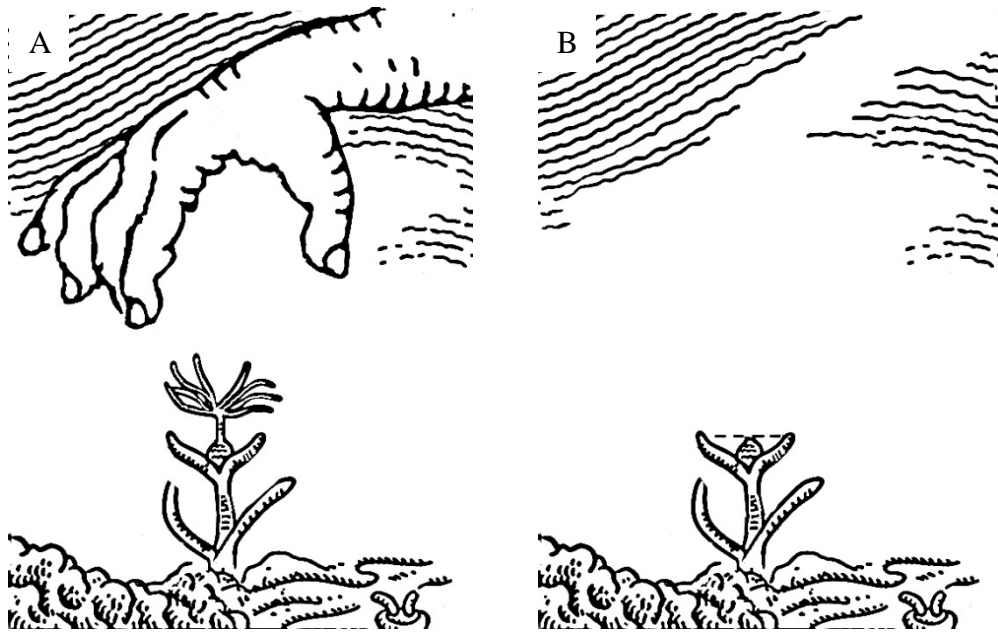


Fig. 9.- A. Flor femenina recién abierta de *Thalassia testudinum*. B. Flor sin estigma, bajo el tratamiento de Ablación.

SEGUNDO TRATAMIENTO (MEMBRANA)

En 2009 (ver ANEXO) se localizaron 60 botones florales pre-antesis (Fig. 10-A) y se cubrieron con una membrana de diálisis en forma de capuchón. La membrana de diálisis se cortó en pequeños tramos de 8-10 cm de largo para formar capuchones, a los cuales se les amarró un extremo con un pequeño listón para que quedaran cerrados por la parte superior (Fig. 10-B). La membrana de diálisis se eligió para este experimento debido a que permite el paso del agua, pero no el paso del polen. El capuchón que se formó con la membrana de diálisis se colocó en un aro de alambre con una pequeña estaca, la estaca se diseñó con la finalidad de sujetarla al fondo (Fig. 10-C). Una vez que se colocó el capuchón con la estaca sobre el botón floral (Fig. 11-A), la base del capuchón se cubrió con arena para así evitar el contacto de polen con los estigmas. Las membranas se dejaron durante unos 3-5 días después de que se colocaron (Fig. 11-B) y se retiraron una vez que los estigmas

se oxidaron y/o se habían desprendido. Posteriormente se colocaron las marcas con las mallas protectoras contra la herbivoría y se dejó madurar las flores femeninas. Se recolectaron 11 flores a intervalos de 10, 14, 26, 33, 36 y 43 días después de haber iniciado el tratamiento experimental. A las flores en desarrollo restantes se les dejó madurar con el fin de obtener posteriormente semillas. A todas las muestras sometidas a este tratamiento se les denominó como “membrana” y se les representó con una “M” seguido de un número consecutivo.

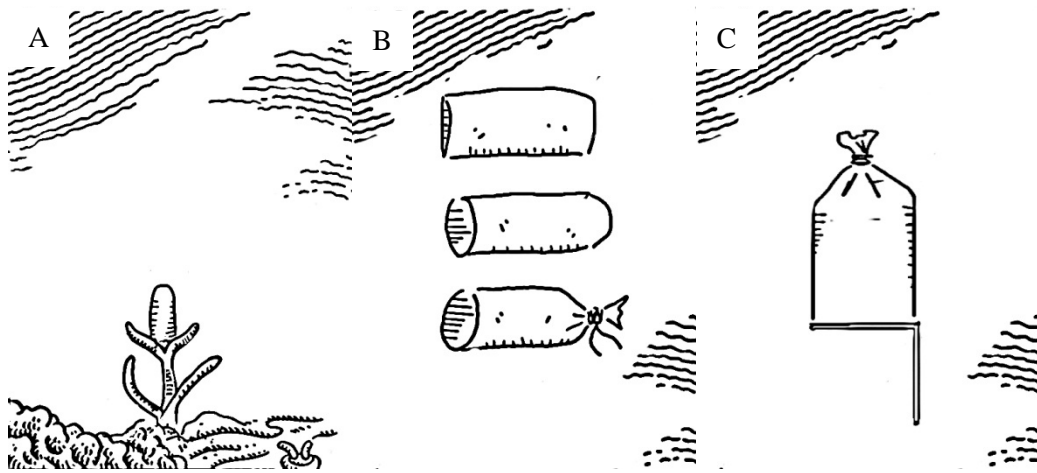


Fig. 10. A. Botón floral femenino de *Thalassia testudinum*. B- Capuchón de membrana de diálisis.

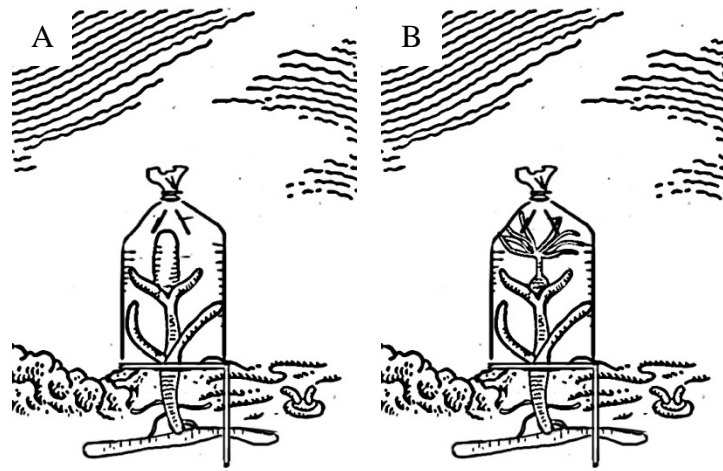


Fig. 11. A. Botón floral femenino de *Thalassia testudinum* con el capuchón de membrana de diálisis. B- Flor de *Thalassia testudinum* con capuchón de membrana de diálisis.

CONTROL

Se buscaron 70 flores femeninas (ver ANEXO) recién abiertas, sin tomar en cuenta si pudieran estar polinizadas, incluso con los estigmas oxidados. Se marcaron y se dejaron como control. Se recolectaron 12 flores a intervalos de 10, 26, 33 y 36 días después del marcaje inicial, para su análisis de desarrollo en el laboratorio. Esto se hizo con el fin de tener un marco referencial con el cual comparar los resultados de los tratamientos experimentales. A todas las flores en desarrollo sometidas a este tratamiento se les denominó como "control" y se les representó con una "C" seguido de un número consecutivo.

RECOLECTA

El material que se utilizó para este estudio fue recolectado en la primavera del 2009 (Tabla 1). Previamente, el personal del laboratorio de pastos marinos de la unidad Académica de Puerto Morelos Quintana Roo, recolectó 13 frutos bajo tratamiento de membrana de diálisis a intervalos de 1-5, 7 y 42 días después de la antesis para el análisis en el laboratorio durante el verano del 2007 y del 2008. Todas las muestras recolectadas por el laboratorio de pastos marinos sometidas al tratamiento de "membrana" se les denominaron "MD" seguido del número correspondiente al de los días de tratamiento (Tablas 2). También durante los veranos del 2007 y 2008, el personal del laboratorio de pastos marinos recolectó 23 flores a intervalos de 0-5, 8, 9 y 42 días de desarrollo después del marcaje. Todas las muestras "control" recolectadas se les denominaron "CD" seguido del número correspondiente al de los días de desarrollo después del marcaje (Tabla 3).

Dado que los botones florales no presentan la antesis al mismo tiempo, en la primavera del 2009 se realizó un experimento que permitiera contar con muestras experimentales y controles con diferentes días de desarrollo. De esta forma en la semana número uno, se marcaron 30 botones o flores en antesis. A la segunda semana otros 30 y a la tercera semana otros 30 y así sucesivamente hasta marcar 180 botones y/o flores en antesis. Se recolectaron escalonadamente para procesarlas y tener muestras de diferentes días de desarrollo.

En total en 2009 se marcaron 180 botones o flores frescas y se colectaron 34 muestras de diferentes tratamientos con diferentes días de desarrollo (Tabla 1).

Tabla 1. *Thalassia testudinum*. Muestras colectadas en el 2009 con los diferentes tratamientos M = Membrana, A = Ablación, C = Control. También se indica el número de días que se dejaron madurar los frutos después del marcaje (vea ANEXO para datos adicionales).

Tratamiento	Días	Número Frutos
M - 7, 9	10	2
M - 15	14	1
M - 35, 43, 48	26	3
M - 2, 16, 19	33	3
M - 11	36	1
M - 5	43	1
A - 5, 6, 7	10	3
A - 21, 22, 25, 49	26	4
A - 15,17, 33	33	3
A - 9	36	1
C - 1, 7, 8	10	3
C - 25, 31, 65, 70	26	4
C - 17, 18, 34, 36	33	4
C - 2	36	1
Total		34

FIJACIÓN

Las flores y frutos recolectados se guardaron en agua del mar y se fijaron dentro de 1-2 horas después de ser recolectados con FAA (formol, ácido acético, alcohol etílico al 96% y agua (1: 0.5 : 5 : 3.5)).

DESHIDRATACIÓN

En el laboratorio de desarrollo en plantas, el material fijado en FAA se enjuagó en agua durante 10 o 15 minutos y posteriormente se transfirió a soluciones graduales de etanol (30, 50, 70, 85 ,96 y 100%), en periodos de 2 horas cada uno.

INFILTRACIÓN E INCLUSIÓN

En paraplast; las muestras se infiltraron en tres mezclas consecutivas de xilol-paraplast (2:1, 1:1, 1:2) durante 12 horas como mínimo cada una, en una estufa con temperatura entre 58 y 60°C, por último se hicieron dos cambios de paraplast pura de al menos 24 horas cada uno y se incluye el material en paraplast puro.

En LR White; las muestras se infiltraron en tres mezclas consecutivas de LR White y etanol absoluto (1:3, 1:1, 3:1) por una hora en cada uno. Después se transfirieron a dos cambios de LR White puro, por una hora en cada uno y un último cambio de LR White por 24 horas a 4°C como mínimo. Posteriormente se incluyeron en cápsulas de gelatina en la estufa a 40-45°C.

OBTENCIÓN DE CORTES

Las muestras en paraplast se cortan utilizando un microtomo a un grosor de 8-10 μm .

Las muestras en LR White se cortaron en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio previamente manufacturadas y se obtuvieron cortes de aproximadamente 1-3 μm .

TINCIÓN

En paraplast; los cortes se tiñeron con safranina en metilcelosolve durante 24 horas y posteriormente se contrastaron con verde rápido en metilcelosolve. En LR White; los cortes se tiñeron con azul de Toluidina.

MICROSCOPIA

Se utilizó el microscopio de campo claro para analizar los cortes obtenidos con las dos técnicas de inclusión y de tinción.

OBSERVACIÓN DE TUBOS POLÍNICOS POR MEDIO DE FLUORESCENCIA

Dado que en el tratamiento experimental "Ablación" se obtuvieron frutos a pesar de la ablación de parte del estilo con los estigmas, se decidió probar la existencia de tubos polínicos en la parte restante del estilo y que parte del ovario. Esto se hizo con la finalidad de comprobar si el desarrollo de los frutos era producto de apomixis o de la polinización a pesar del tratamiento.

Utilizando el material fijado en FAA, se suavizó el tejido del estilo restante hasta la base del ovario, con una solución de NaOH durante 30 minutos. Después se enjuagó con agua destilada tres veces consecutivas por 10 min. Posteriormente se sumergió el tejido en gotas de azul de anilina al 1% en K_3PO_4 0.1M durante 24 horas a 4°C.

MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Para observar al microscopio de fluorescencia se agregó nuevamente gotas de azul de anilina y se realizó un squash. Se observaron al microscopio de fluorescencia bajo luz ultravioleta para detectar la presencia de calosa dejada en las paredes de los tubos polínicos.

EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO "MESOCOSMOS"

En el mesocosmos se diseñó otro experimento para ayudar a revelar si existe apomixis en esta especie. El experimento consistió en tomar ocho fragmentos de pradera de *T. testudinum* con un nucleador (20cm diámetro) y la primera muestra experimental se colocó en un mesocosmos (1.20m x x0.30 x 0.60m), el cual cuenta con agua corriente de mar y se excluyeron todas las flores masculinas, dejando solamente flores femeninas. En otro mesocosmos de control se dejaron dos núcleos

de pasto marino con ambos tipos de flores (femeninas y masculinas) y se recolectaron flores femeninas al terminar el experimento.

Tabla 2. Número final de muestras experimentales de membrana con las que se realizaron las observaciones en el laboratorio. El número de muestras se refiere al número de frutos o flores, cada fruto puede tener más de una semilla.

Experimental Membrana		
Clave	N flores/ frutos	Días de desarrollo
MD1	2	1
MD2	2	2
MD3	2	3
MD4	2	4
MD5	2	5
MD7	1	7
M35	3	26
M16	ND	33
M11	4	36
MD42	2	42
M5	ND	43
	Total= 20	

Tabla 3. Número final de muestras control con las que se realizaron las observaciones en el laboratorio. El número de muestras se refiere al número de frutos o flores, cada fruto puede tener más de una semilla.

Control		
Clave	N Flores/ frutos	Días de desarrollo
CD0	3	0
CD0	2	0
CD1	3	1
CD2	3	2
CD3	3	3
CD4	2	4
CD5	2	5
CD8	3	8
CD9	2	9
C65	1	26
C2	6	36
CD42	2	42
	Total = 30	

RESULTADOS

RECOLECTAS 2007 Y 2008

CONTROL

En los controles de *Thalassia testudinum* de 2007 y 2008 sólo pudimos observar etapas posteriores a la megagametogénesis. Los embriones encontrados tenían ocho días de desarrollo después del marcaje (Tabla 4). Estos embriones estaban en la etapa globular en donde se observan las divisiones transversales y longitudinales del embrión, el cual está unido a la célula del suspensor (Fig.12).

Tabla 4. *Thalassia testudinum*. 2007 y 2008. Muestras control, sin tratamiento, procesadas en el laboratorio.

Días desde el marcaje	Número de Flores	Flores Procesadas	Embriones encontrados
0	5	1	0
1	3	1	0
2	3	1	0
3	3	2	0
4	2	1	0
5	2	2	0
8	3	3	3
Total	21	11	3

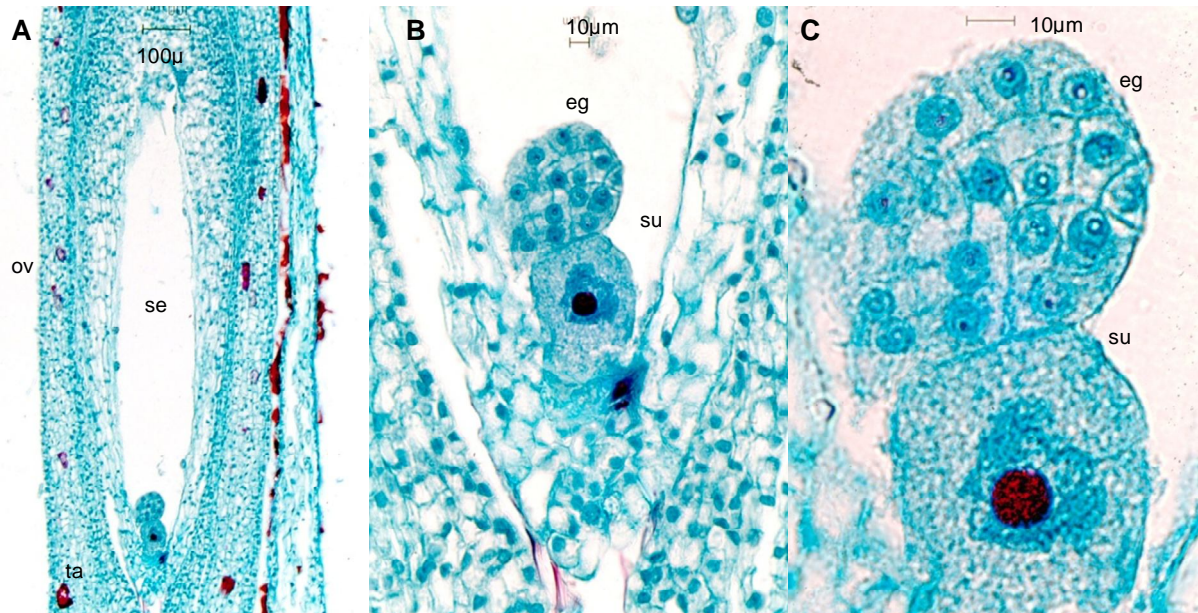


Fig. 12. *Thalassia testudinum* 2008 corte longitudinal de un óvulo joven. Control día ocho muestra II: A.- (ov) óvulo, (ta) taninos, (se) saco embrionario. B.- (eg) embrión globular, (su) suspensor. C.- (eg) embrión globular, (su) suspensor.

EXPERIMENTAL MEMBRANA

En las muestras experimentales con membrana de 2007 y 2008 Tabla 5, sólo se observaron muestras posteriores a la megagametogénesis, sin embargo se encontraron proembriones con cuatro y cinco días de desarrollo después del marcaje (Fig. 13-14). Las células que se observan en el saco embrionario (Fig. 13-A) son producto de las primeras divisiones celulares, del proembrión, por lo cual se puede decir que la primera división es transversal y asimétrica formando una célula apical (ca) pequeña y una célula basal (cb) grande y orientada hacia la zona micropilar (Fig. 13-B). La célula basal dará origen de manera directa a la célula del suspensor, la célula apical formará el cuerpo del embrión Fig. 13-B. Al dividirse la célula apical tanto longitudinal como transversalmente se forma un proembrión de cuatro o seis células Fig.14.

Tabla 5. *Thalassia testudinum*. 2007 y2008. Muestras del tratamiento experimental Membrana, procesadas en el laboratorio, provenientes de la primera y segunda etapa. En las muestras del día 5 después de marcadas se encontró una flor con dos óvulos con un embrión en cada uno, lo cual corresponde al desarrollo normal descrito por (Jiménez-Durán, 2004).

Días desde el marcate	Número de Flores	Flores Procesadas	Embriones encontrados
1	2	2	0
2	2	2	0
3	2	2	0
4	2	2	1
5	3	3	4
7	1	1	0
Total	11	11	5

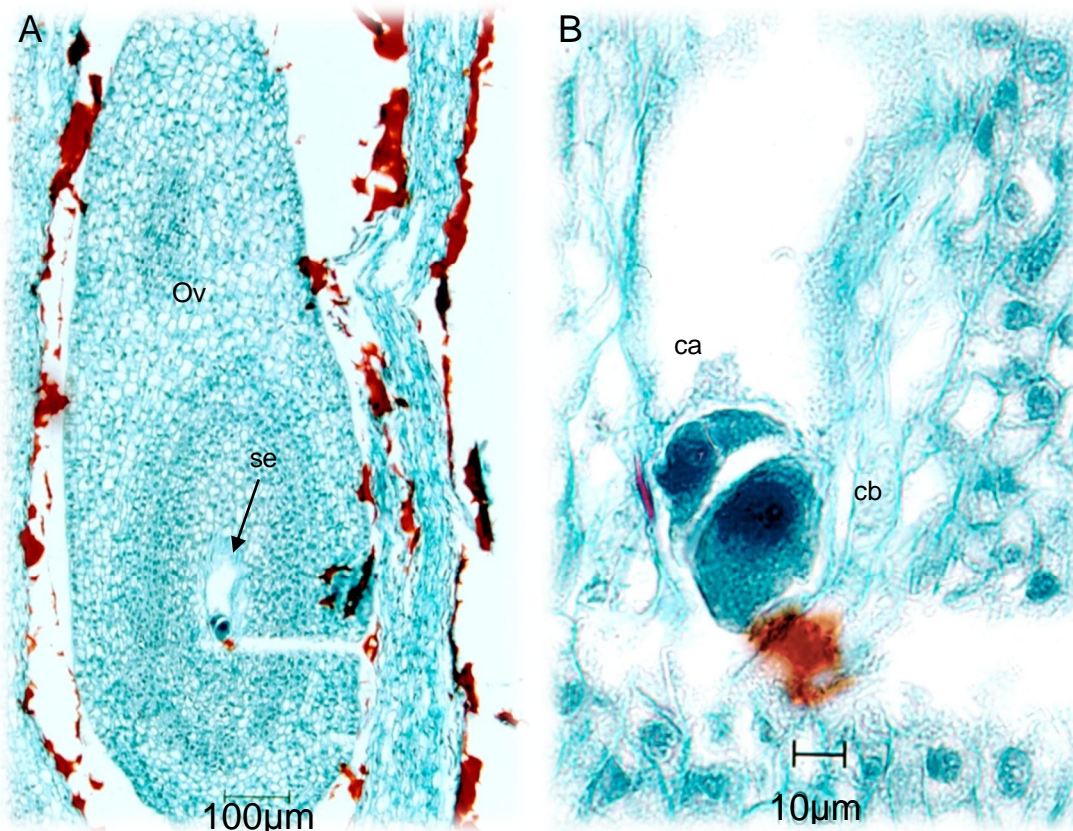


Fig. 13. *Thalassia testudinum*. 2007 y2008. Corte longitudinal del óvulo. Experimental membrana día cuatro muestra I: A.- (ov) óvulo, (se) saco embrionario. B.- (ca) célula apical, (cb) célula basal.

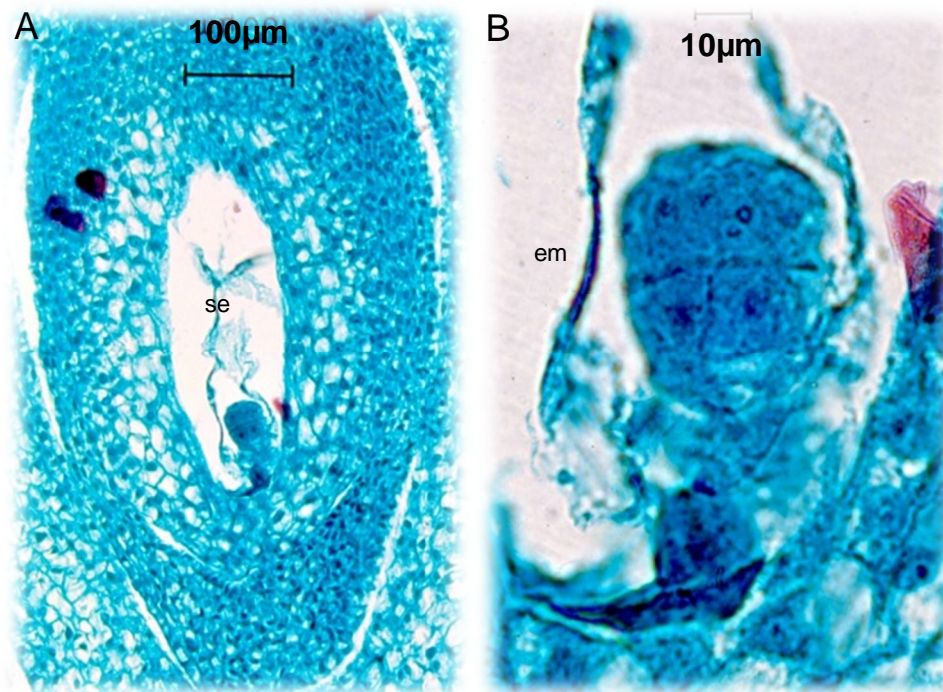


Figura 14. *Thalassia testudinum*. 2007 y2008. Corte longitudinal del óvulo en una flor joven. Experimento tratamiento con Membrana día cinco muestra II A.- (se) saco embrionario. B.- (em) embrión.

Posteriormente las células provenientes de las primeras divisiones se subdividen y comienzan a formar el cuerpo del embrión (Fig. 14).

En las muestras de tratamientos y controles restantes, no se pudo observar, la formación o desarrollo de ninguna estructura embrionaria, o de sacos embrionarios.

RECOLECTA DEL 2009

CONTROL

Al cortar las muestras control del verano de 2009 se observaron embriones con 26 y 36 días de desarrollo después del marcaje (Fig. 15). En estos cortes se logró observar semillas abortivas y con desarrollo normal (Fig. 15-A). La semilla normal,

se encuentra constituida por el cotiledón, el hipocótilo y el meristemo apical, que están rodeados claramente por el tejido nucelar (Fig. 15-B).

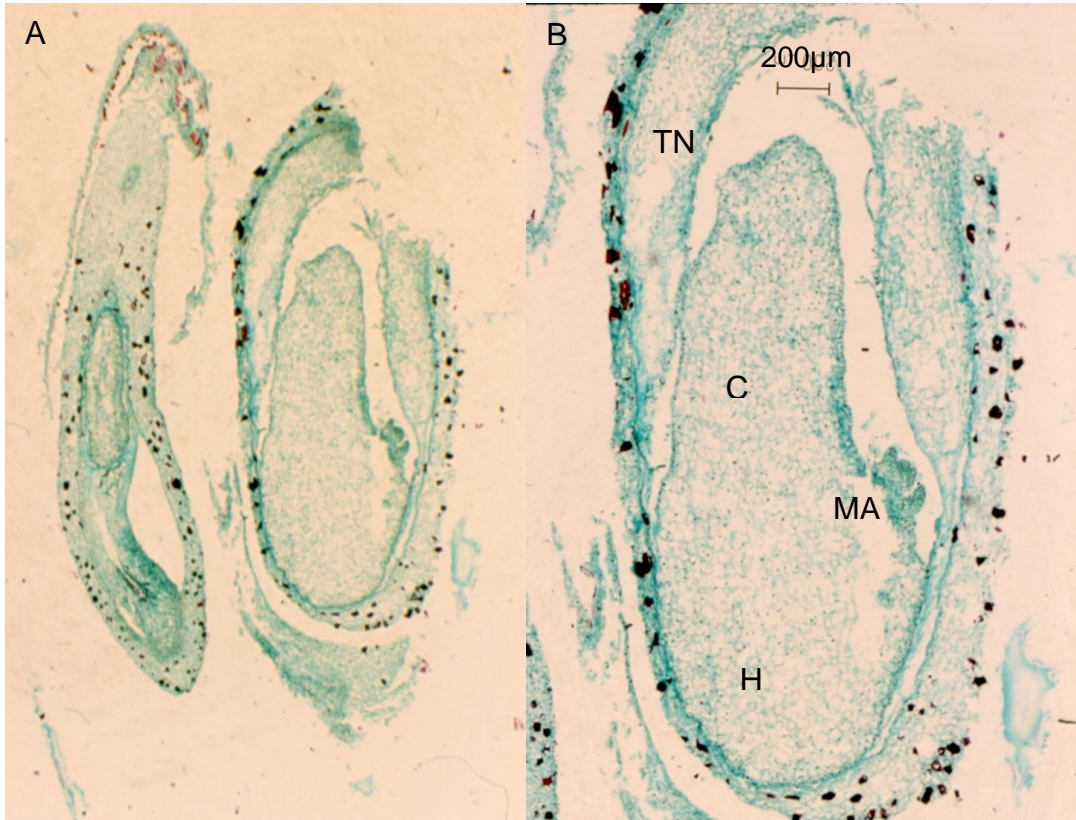


Figura 15. Semillas de *Thalassia testudinum* con desarrollo normal y abortiva. 2009. Corte longitudinal en paraplast. Control Día 36. A. -Semillas, izq. abortada, der. sana, B.- (TN) tejido nucelar, (C) Cotiledón, (MA) Meristemo apical, (H) Hipocótilo.

EXPERIMENTAL MEMBRANA

Las muestras experimentales de 36 días de desarrollo después del marcaje (Fig. 16-17) podemos observar dos semillas en las cuales se identifican claramente la cubierta seminal, el tejido nucelar, el cotiledón y el hipocótilo (Fig. 16) y en la segunda semilla (Fig. 17-A) se aprecia el meristemo apical y un primordio foliar (Fig. 17-B), lo cual coincide con las muestras control de los mismos días.

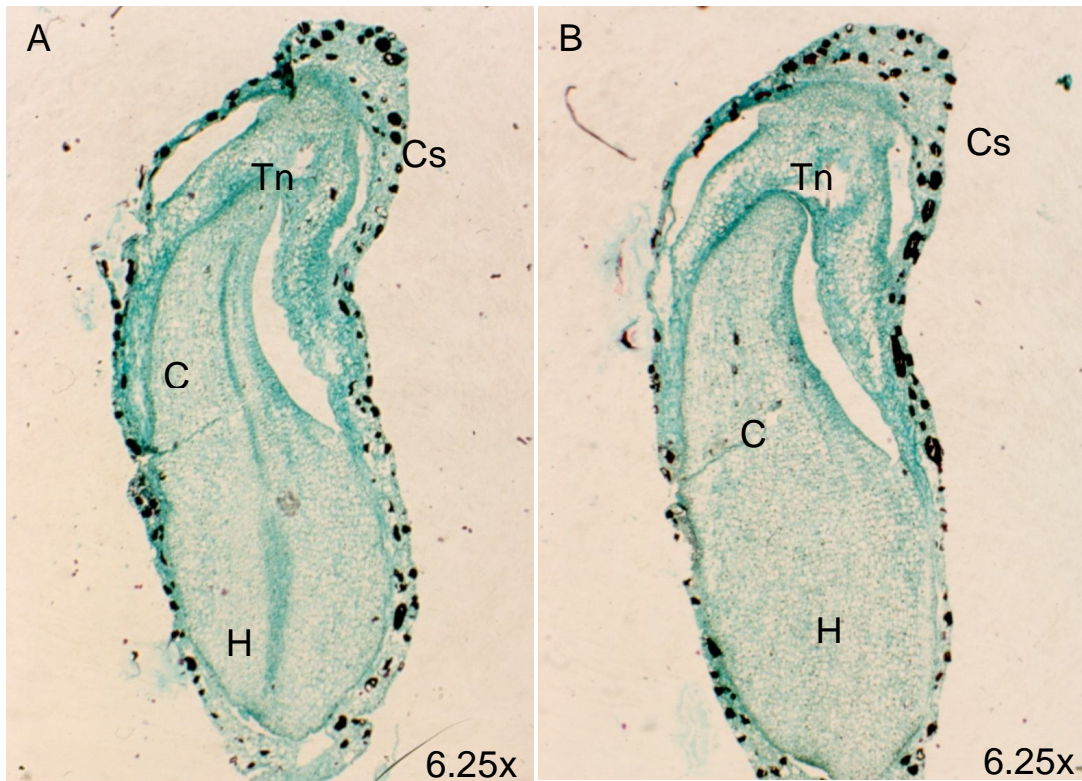


Fig.16 Semillas de *Thalassia testudinum* con desarrollo normal. 2009. Corte longitudinal en paraplast. Experimental membrana, Día 36, A.- (Cs) Cubierta seminal, (Tn) Tejido nucelar, (C) Cotiledón, (H) Hipocótilo, B.- (Cs) Cubierta seminal, (Tn) Tejido nucelar, (C) Cotiledón, (H) Hipocótilo.

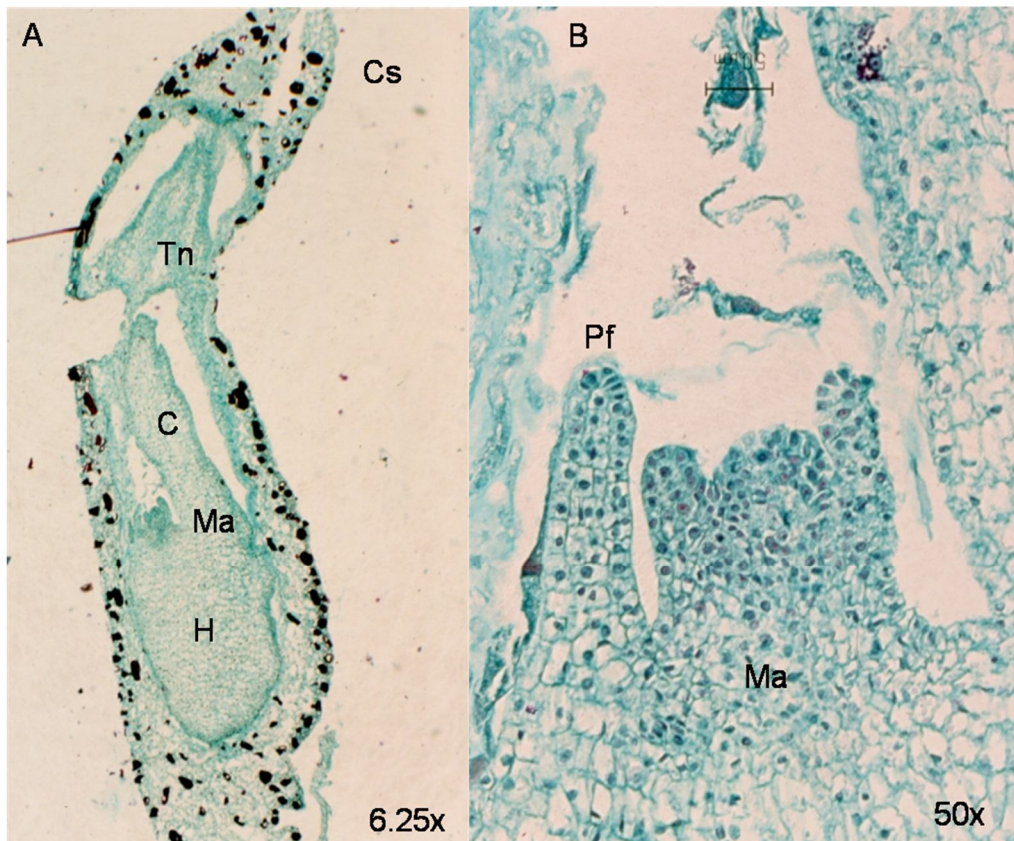


Fig. 17 *Thalassia testudinum*. 2009. Corte longitudinal en paraplast de semilla, el embrión ya cuenta con un meristemo apical Experimental membrana, Día 36, A.- (Cs) Cubierta seminal (Tn) Tejido nucelar, (C) Cotiledón, (Ma) Meristemo apical, (H) Hipocótilo. B.- (Ma) Meristemo apical, (Pf) Primordio foliar.

Las muestras provenientes del tratamiento "Ablación" no se muestran debido a que se encontraron tubos polínicos en la parte restante del estilo.

Con respecto a las muestras restantes del 2009, se disectaron para contabilizar las semillas con desarrollo y aquellas que fueran abortadas, con la finalidad de estimar, si el tratamiento podría influir de alguna manera, en la cantidad de semillas producidas por la planta (Tabla 6).

Tratamiento	Individuo	Días	Desarrolladas	Abortiva	Total
Membrana	m2	33	0	3	3
Membrana	m5	43	0	5	5
Membrana	m7	10	5	0	5
Membrana	m9	10	4	0	4
Membrana	m11	36	3	1	4
Membrana	m15	14	5	0	5
Membrana	m16	33	2	3	5
Membrana	m19	33	2	1	3
Membrana	m35	26	2	1	3
Membrana	m43	26	0	3	3
Membrana	m48	26	0	0	0
Control	C1	10	0	0	0
Control	C2	36	4	2	6
Control	C7	10	0	5	5
Control	C8	10	0	3	3
Control	C17	33	1	2	3
Control	C18	33	0	3	3
Control	C25	26	0	3	3
Control	C31	26	0	2	2
Control	C34	33	4	1	5
Control	C36	33	1	2	3
Control	C65	26	1	0	1
Control	C70	26	3	0	3

Tabla 6.

Con estos resultados se realizó una prueba estadística de (t) para comparar si la proporción de semillas abortivas y con desarrollo fue igual en el tratamiento experimental, como en el control. En la distribución de las semillas con desarrollo se obtuvo que $P > |t| = 0.2274$ y para las semillas abortivas que $P > |t| = 0.5838$. Esto significa que el tratamiento experimental (Membrana) no afectó el número de semillas con desarrollo o abortivas producidas.

MESOCOSMOS

Las muestras provenientes del experimento del mesocosmos se procesaron con LR White y se cortaron en el ultramicrotomo. En las muestras del mesocosmos con solamente flores femeninas no se observó desarrollo de embriones.

OBSERVACIÓN DE TUBOS POLÍNICOS POR MEDIO DE FLUORESCENCIA

Se analizaron ocho flores femeninas del 2009, del tratamiento "Ablación" y se encontraron tubos polínicos en cuatro de estas (D5, D9, D15 y D25)(ver ANEXO).

Se observaron tubos polínicos en tres zonas diferentes que van de la parte media del estilo hasta la parte superior del ovario (Figs. 18-19).

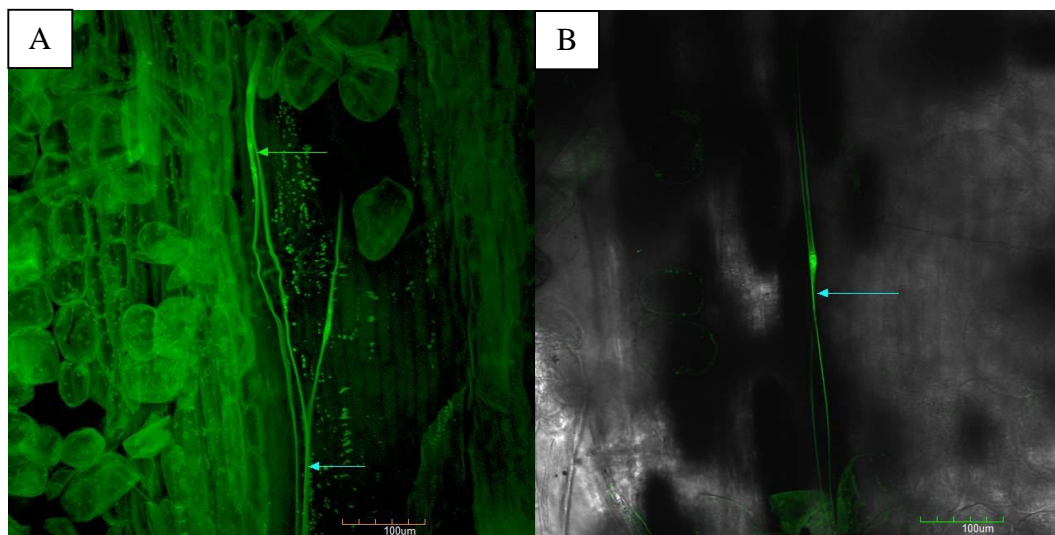


Fig. 18 *Thalassia testudinum*. 2009. Experimental Desnudo A.- Tubos polínicos en la parte media del estilo. B.- Tubos polínicos en la parte superior del ovario.

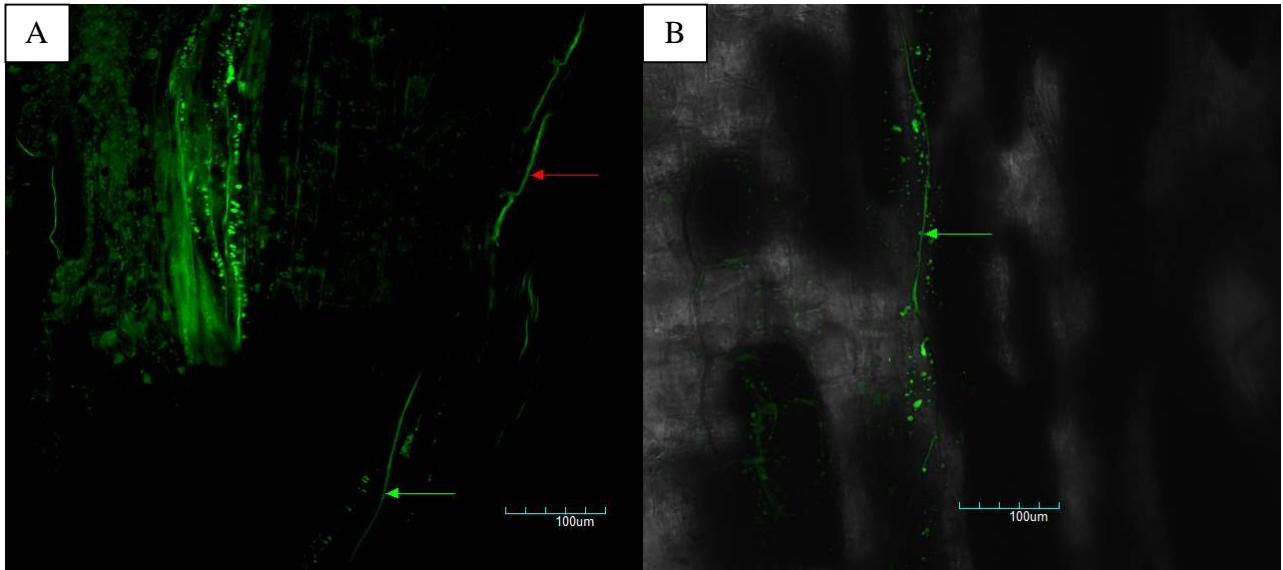


Fig. 19 *Thalassia testudinum*. 2009. Experimental Desnudo A.- Tubos polínicos en la parte inferior al corte del estilo. B.- Tubos polínicos en la parte superior del ovario.

DISCUSIÓN

Jiménez-Durán, (2004), describió el desarrollo de los frutos y semillas de *T. testudinum* y registró sólo una vez, una semilla con más de un embrión aparentemente adventicio y sugirió, la presencia de un embrión apomíctico. Basados en esta información se planteó el presente trabajo. Además de éste, sólo dos trabajos (McMillan & Williams, 1980) (York *et al.*, 2008) han estudiado la apomixis en pastos marinos (*Halophila decipiens*, *Halophila johnsonii*) y sugieren que podría haber apomixis, sin embargo, sus resultados no son concluyentes.

Anteriormente, Waycott & Barnes (2001) y Schlueter & Guttman (1998) propusieron que los pastos marinos tenían un bajo nivel de diversidad genotípica, debido a sus características clonales y al reducido establecimiento de plántulas provenientes de semillas con origen sexual. Posteriormente Muñoz- Salazar *et al.* (2005) y van Dijk & van Tussenbroek (2010), con el uso de técnicas genéticas moleculares, comprobaron que la diversidad genética en *Thalassia testudinum* puede ser alta.

La reproducción sexual de *T. testudinum* tal como la describen Cox & Tomlinson, (1988), se lleva a cabo de manera muy singular y con un gran número de desafíos. Para que se de la reproducción sexual, primero, debe de existir un sitio con floración abundante, por lo general, estos sitios son poco comunes y se desconoce por qué sólo en algunos sitios de la pradera se desarrollan flores, además el porcentaje de floración es muy bajo (Orpurt & Boral, 1964 ; Grey & Moffler, 1978 ; van Tussenbroek, 1994). Segundo, es necesaria la sincronización de la antesis, en las flores masculinas y femeninas, que se cree es regulada por el fotoperiodo (van Tussenbroek *et al.*, 2008). Tercero, el polen debe viajar hacia la flor femenina impulsado únicamente por las corrientes, con la posibilidad de desplazarse en cualquier otra dirección (Cox & Knox, 1989). Cuarto, las flores de una misma planta no se pueden polinizar porque *T. testudinum* es una especie dióica por lo que el polen debe llegar no sólo a otro individuo si no que este además debe ser femenino (Grey & Moffler, 1978). Cinco, la ventana de tiempo para la polinización, que brindan las flores masculinas, en la liberación del polen es reducida, de una a dos horas (van Tussenbroek *et al.*, 2008). Seis, se ha descrito un considerable nivel de herbivoría del polen en esta especie, cerca del 30% de las flores masculinas marcadas en la investigación de van Tussenbroek *et al.* (2008) sufrieron herbivoría. Dado todo lo anterior se aprecia que la polinización hidrófila de *T. testudinum* necesita que muchos factores se conjunten y estén perfectamente sincronizados, por lo que no sería raro inferir, que en ocasiones, exista una limitación de polen. Para la producción de semillas apomicticas en *T. testudinum*, la limitación por polen no sería un impedimento, para que los frutos y semillas de las plantas femeninas se desarrollaran. El gasto energético invertido en la flor femenina por la planta y particularmente en los óvulos, no sería un desperdicio, porque la apomixis facultativa podría producirse en lugar de la singamia y se aprovecharían los recursos ya invertidos.

Con respecto a la dispersión de las semillas, en *Thalassia testudinum*, ésta se lleva a cabo a través de los frutos de dos formas diferentes: la primera es a través de la liberación de las semillas por el fruto, cuando aún se encuentra unido a la planta madre, con lo cuál, las semillas se liberan en el agua y la distancia que alcanzan a recorrer, es relativamente corta y está dada por el tiempo que puedan flotar o ser transportadas por las corrientes en el fondo. Jiménez-Durán (2004) estimó que la distancia máxima alcanzada por este tipo de dispersión era de 180cm. La segunda forma de dispersión, consiste en que el fruto se desprende del pedicelo que lo une a la planta madre y flota hasta la superficie marina y es arrastrado por el oleaje o las corrientes. Alrededor del 10% de los frutos de *T. testudinum* flotan y pueden ser arrastrados por corrientes con un promedio máximo de 106 km dentro de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, pero en condiciones de Mar abierto en la corriente de Yucatán el cálculo es de 300-400 km, cabe mencionar que estos cálculos no consideran las condiciones de tormenta o huracanes en donde la dispersión podría ser mucho mayor (Jiménez-Durán, 2004). Los datos genéticos reportados por van Dijk, (2009), muestran que no hay poblaciones que realmente esten aisladas de las demás y también que hay migración de genes entre todas las poblaciones. También añaden que no es necesario que exista una gran cantidad de frutos que viajen entre poblaciones para mantener la diversidad ya que son organismos muy longevos (van Dijk & van Tussenbroek, 2010). Sí las poblaciones de *T. testudinum* presentan apomixis, las semillas apomicticas que logren viajar entre poblaciones, podrían tener una mayor oportunidad de acentarse dentro de las nuevas poblaciones, esto se debe a que las semillas producidas mediante la reproducción sexual, no han sido sujetas de la selección natural y sus genes por así decirlo “no están garantizados”. Si estas semillas apomicticas dan lugar a una planta capaz de reproducirse sexualmente (apomixis facultativa) podría entonces aumentar la variabilidad genética de la población hospedera ó si no desarrolla

nuevas semillas sexuales, puede de cualquier forma, garantizar la supervivencia del mismo geneto.

En este trabajo se plantearon dos experimentos para probar la existencia de apomixis, el primer diseño está basado en la experiencia previa con plantas acuáticas no sumergidas y dulceacuícolas, Luna-Ramos *et al.* (2012) en el que se logró un embolsado exitoso con flores de *Marathrum* (Podostemaceae) para controlar la polinización. Al embolsar las flores submarinas de *T. testudinum* con membranas de diálisis, se permitió el desarrollo normal de la flor pero evitando el paso de polen.

Con las muestras obtenidas a partir de los experimentos usando membranas de diálisis, fue posible sugerir la presencia de semillas apomícticas, sin embargo al no contar con las etapas más tempranas del desarrollo embrionario (a partir de la primera división del saco embrionario) y de la estructura de la semilla en sus primeras etapas de desarrollo, no fue posible saber que tipo de apomixis presenta.

El segundo diseño experimental consistió en la ablación del estigma y de parte del estilo, con el propósito de que los granos de polen no encontraran una superficie receptora (el estigma) y no pudieran germinar. Posteriormente en la literatura se encontraron ejemplos de plantas cuya ablación de los estigmas no habría impedido la germinación de granos de polen en el estilo y la consecuente formación de tubos polínicos (Shivanna, 2003). Dado lo anterior, los resultados del tratamiento "Ablación" no fueron tomados en cuenta dentro de los experimentos para demostrar la apomixis, pero sí se pudo detectar la presencia de tubos polínicos en los restos de los estilos. De acuerdo con lo anterior, podemos suponer que las flores femeninas de *T. testudinum* que hayan sufrido daños por herbivoría o por cualquier otra razón, tienen la capacidad de ser polinizadas a pesar de carecer del estigma, la herbivoría de los pastos marinos es un fenómeno muy común ya que los peces,

tortugas, manatíes y algunos invertebrados, se alimentan comúnmente de ellos (van Tussenbroek *et al.*, 2010). Creemos que gracias a la colocación de las mallas protectoras de plástico que colocamos sobre todas las muestras marcadas durante este trabajo, se logró disminuir la herbivoría de las flores, ya que no registramos ninguna flor o fruto dañado considerablemente por esta razón.

En conclusión, las semillas apomomíticas podrían poseer un valor ecológico mayor o igual al que se le atribuye a las de origen sexual, ya que podrían ayudar a preservar un nivel óptimo de variabilidad en las poblaciones y entre las poblaciones, así como ayudarían a preservar los genomas “exitosos” de algunos genets. Es necesario hacer más estudios de tubos polínicos para comprobar que las membranas son un factor determinante en la limitación del polen en estas condiciones.

CONCLUSIONES

- Se sugiere fuertemente la presencia de apomixis en flores femenias de *Thalassia testudinum* cubiertas con membrana de diálisis.
- La membrana de diálisis no afectó el desarrollo de los frutos.
- La presencia de tubos polinicos indica que la ablación de los estigmas de *Thalassia testudinum* no es un impedimento para que se lleve a cabo la polinización.
- El uso de las mallas sobre las flores impidió la herviboría.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, J. D. (2006). Sexual Reproduction of Seagrasses: Pollination in the Marine Context. En J. D. Ackerman, A. W. D. Larkum et al. (eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (págs. 89-109). Springer.
- APG, (. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc*, 141:399–436.
- Asker, E. S., & Jerling, L. (1992). *Apomixis in plants*. USA: CRC.
- Batygina, T. B. (2009). Amphimixis and Apomixis. En T. B. Batygina, *Embriology of Flowering Plants: Terminology and Concepts : Volumen 3: Reproductive Systems* (pág. 557). Enfield, New Hampshire: Science Publishers.
- Bicknell, R. A., & Koltunow, A. M. (2004). Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. *The Plant Cell*, S228–S245.
- Campbell, C. S., & Dickinson, T. A. (1990). Apomixis, patterns of morphological variation, and species concepts in subfam. Maloideae (Rosaceae). *Syst. Bot.*, 15(1): 124-135.
- Carman, J. G. (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biol J Linn Soc*, 61:51–94.
- Cook, C. K. (1990). *Aquatic plant book*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishers.
- Cox, A. P., & Knox, R. B. (1989). Hydrophilous pollination: Two-Dimensional dimensional pollinization in hydrophilous plants. *Amer. J. Bot.*, 76(2):164-175.
- Cox, P. A., & Tomlinson, P. B. (1988). Pollination ecology of seagrass, *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae), in st. Croix. *Amer. J. Bot.*, 958-965.
- Crane, C. F. (2001). Classification of Apomictic Mechanisms. En Y. Savidan, J. G. Carman, & T. Dresselhaus, *The flowering of apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering* (págs. 24-31). México D.F.: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR).
- Den Hartog, C., & Kuo, J. (2006). *Seagrasses: Biology, ecology and conservation*. The Netherlands: Springer.
- Grace, J. B. (1993). The adaptive significance of clonal reproduction in angiosperms: An aquatic perspective. *Aquatic Botany*, 159-180.
- Green, P. E., & Short, F. T. (2003). *World Atlas of Seagrasses*. Berkeley, CA, USA: University of California.

- Grey, W. F., & Moffler, M. D. (1978). Flowering of seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) in the Tampa Bay, Florida area. *Aquatic Botany*, 5; 251-259.
- Gustafsson, A. (1946). Apomixis in higher plants Part 1. The mechanism of apomixis. *Univ. Arrskrift*, 1-67.
- Gustafsson, A. (1947). Apomixis in higher plants. II. The causal aspect of apomixis. *Lunds Universitets Arsskrift Nova Series*, 43 (2):69-179.
- Heck, K. L., Hays, G., & Orth, R. J. (2003). Critical evaluation of the nursery role hypothesis for seagrass meadows. *Marine Ecology Progress Series*, 253, 123-136.
- Hutchinson, E. G. (1975). A treatise on limnology. *Limnological Botany*, 3.
- Jiménez-Durán, K. (2004). *Desarrollo y dispersión de frutos y semillas de Thalassia testudinum Banks ex konig (Hydrocharitaceae)*. México: UNAM, Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias.
- Kaldy, J. E., & Dunton, K. H. (2000). Above- and below-ground production, biomass and reproductive ecology of *Thalassia testudinum* (turtle grass) in a subtropical coastal lagoon. *Marine Ecology*, 271-283.
- Koltunow, A. M. (1993). Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The Plant Cell*, 1425-1437.
- Koltunow, A. M., & Grossniklaus, U. (2003). Apomixis: A Developmental Perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 547-574.
- Kuo, J. C., & den Hartog, D. C. (2000). Seagrasses: a profile of an ecological group. *Biol. Mar. Medit*, 7 (2): 3-17.
- Les, H. D., Alberte, R. S., Mazzella, L., & Procaccini, G. (1997). Chloroplast tRNA^{Leu} (UAA) intron sequences provide phylogenetic resolution of seagrass relationships. *Aquatic Botany*, 62: 269-283.
- Lot, A., Novelo, A., Olvera, M., & Ramírez, P. (1999). *Catálogo de Angiospermas acuáticas de México. Hidrófilas estrictas emergentes, sumergidas y flotantes* (Vol. 33). México: IB y UNAM.
- Lot, A; Novelo, A; Olvera, M; Ramírez, P. (1999). *Catálogo de Angiospermas acuáticas de México. Hidrófilas estrictas emergentes, sumergidas y flotantes* (Vol. 33). México: IB y UNAM.
- Luna Ramos, R., Guzmán Merodio, D., Nuñez Farfán, J., Pilbrick, C. T., Collazo Ortega, M., & Márquez Guzmán, J. G. (2012). Cross compatibility between *Marathrum rubrum* and *M. schiedeanum* (Podostemaceae), two closely species of the Pacific Mexican Coast. *Aquatic Botany*, (en prensa).

- McMillan, C., & Williams, S. C. (1980). Systematic implications of isozymes in *Halophila* section *Halophila*. *Aquat. Bot.*, 9: 21-31.
- Merino, M. I., & Otero, D. L. (1991). *Atlas Ambiental costero. Puerto Morelos Quintana Roo*. México: ICMYL, UNAM.
- Muñiz-Salazar, R., Talbot, S. L., Sage, G. K., Ward, D. H., & Cabello-Pasini, A. (2005). Genetic structure of annual and perennial populations of *Zostera marina* L. along the Pacific coast of Baja California and the Gulf of California. *Molecular Ecology*, 14, 711-722.
- Naumova, T. (1993). *Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony*. CRC, Boca Raton, FL.
- Nogler, G. A. (1984). Gametophytic apomixis. *See Ref.*, 475–518.
- Ourpurt, P. A., & Boral, L. L. (1964). The flowers, fruits, and seeds of *Thalassia testudinum* Koenig. *Bulletin Sciences of the Gulf and the Caribbean*, 296-302.
- Ozias, P. A. (2006). Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25:199–214.
- Phillips, R. C., & Meñez, E. G. (1988). *Seagrasses*. Smithsonian contribution to the marine sciences.
- Pitelka, L. F., & Ashmun. (1985). Physiology and integration of ramets in clonal plants. En L. W. Jackson J. B. C., *Population Biology and evolution of clonal organisms* (págs. 399-436). New Haven and London: Yale University Press.
- Ruiz-Rentería, F., Van Tussenbroek, B. I., & Jordán-Dahlgren, E. (1998). *Puerto Morelos Quintana Roo, México. In CARICOMP - Caribbean Coral Reef, Seagrass and Mangrove Sites*. Paris: UNESCO.
- Schlueter, M. A., & Guttman, S. I. (1998). Gene flow and genetic diversity of turtle grass, *Thalassia testudinum*, banks ex König, in the lower Florida Keys. *Aquatic Botany*, 61, 147-164.
- Shivanna, K. R. (2003). *Pollen Biology and Biotechnology*. New Hampshire: Science Publishers.
- Smith, J. (1841). Notice of a plant which produces perfect seeds without any apparent action of pollen. *Trans Linn Soc Lond*, 18:509–512.
- van Dijk J.K., B. v.-D.-G. (2009). High levels of gene flow and low population genetic structure related to high dispersal potential of a tropical marine angiosperm. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 390: 67–77.
- van Dijk, J. K., & van Tussenbroek, B. I. (2010). Clonal diversity and structure related to habitat of the marine angiosperm *Thalassia testudinum* along the Atlantic coast of Mexico. *Aquatic Botany*, 63-69.

- van Tussenbroek B. I., J. V. (2006). The Biology of Thalassia. Paradigms and recent advances in research. In: Larkum, Orth & Duarte. *Seagrass Biology, Springer, the Netherlands*, 409-439.
- van Tussenbroek, B. I. (1994). Aspects of reproductive ecology *Thalassia testudinum* in Puerto Morelos reef lagoon, México. *Botanica Marina*, 37: 413-419.
- van Tussenbroek, B. I., Wong, R. J., & Márquez-Guzmán, J. (2008). Synchronized anthesis and predation on pollen in the marine angiosperm *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Mar Ecol Prog Ser*, 119-124.
- van Tussenbroek, B. I., Wong, R. J., & Márquez-Guzmán, J. (2008). Synchronized anthesis and predation on pollen in the marine angiosperm *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Mar Ecol Prog Ser*, 119-124.
- van Tussenbroek, B., & al., e. (2010). Pollen limitation in a dioecious seagrass: evidence from a field experiment. *Marine Ecology Progress Series*, 419: 283-288.
- Walker, D. I., Kendrick, G. A., & McComb, A. J. (2006). Decline and Recovery of Seagrass Ecosystems The Dynamics of Change. En A. W. al, *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (págs. 551-565). Springerlink.
- Waycott , M., & Barnes, P. (2001). AFPL diversity within and between populations of Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Marine Biology* , 139, 1021 - 1028.
- Waycott, M., & Les, H. D. (2000). Current perspectives on marine angiosperm evolution. *Biol. Mar. Medit.*, 7 (2):160-163.
- Whitton, J., Sears, C. J., Baack, E. J., & Otto, S. P. (2008). The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *Int. J. Plant Sci.*, 169(1):169–182.
- York, R. A., Durako, M. J., Judson Kenworthy, W., & Wilson Freshwater, D. (2008). Megagametogenesis in *Halophila johnsonii*, a threatened seagrass with no known seeds, and the seed-producing *Halophila decipiens* (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*, 88: 277-282.

ANEXO

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL ABLACIÓN							
Ablación	Número	Fecha de marcaje	Estado	Protección	Fecha de colecta	Días de Marcaje	Diám. fruto mm
Ablación	1	04/06/2009	sin datos	x			
Ablación	2	04/06/2009	sin datos	x			
Ablación	3	04/06/2009	sin datos	x			
Ablación	4	04/06/2009	sin datos	x			
Ablación	5	04/06/2009	sin datos	x	16/04/2009	10	4.56
Ablación	6	04/06/2009	sin datos	x	16/04/2009	10	4.33
Ablación	7	04/06/2009	sin datos	x	16/04/2009	10	4.37
Ablación	8	04/06/2009	sin datos	x			
Ablación	9	04/06/2009	Antesis	x	11/05/2009	36	9.72
Ablación	10	04/06/2009	Antesis	x			
Ablación	11	04/09/2009	Botón	x			
Ablación	12	04/09/2009	Botón	x			
Ablación	13	04/09/2009	Botón	x			
Ablación	14	04/09/2009	Botón	x			
Ablación	15	04/09/2009	Botón	x	11/05/2009	33	6.85
Ablación	16	04/09/2009	Botón	x			
Ablación	17	04/09/2009	sin datos	x	11/05/2009	33	3.95
Ablación	18	04/09/2009	sin datos	x			
Ablación	19	04/09/2009	Antesis	x			
Ablación	20	04/09/2009	Antesis	x			
Ablación	21	16/4/2009	Botón	x	11/05/2009	26	4.84
Ablación	22	16/4/2009	Botón	x	11/05/2009	26	4.39
Ablación	23	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	24	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	25	16/4/2009	Botón	x	11/05/2009	26	4.54
Ablación	26	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	27	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	28	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	29	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	30	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	31	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	32	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	33	16/4/2009	Botón	x	18/05/2009	33	4.21
Ablación	34	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	35	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	36	16/4/2009	Antesis	x			
Ablación	37	sin datos	sin datos	Sin datos			
Ablación	38	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	39	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	40	sin datos	sin datos	Sin datos			
Ablación	41	sin datos	sin datos	Sin datos			
Ablación	42	sin datos	sin datos	Sin datos			
Ablación	43	sin datos	sin datos	Sin datos			
Ablación	44	sin datos	sin datos	Sin datos			
Ablación	45	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	46	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	47	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	48	16/4/2009	Botón	x			
Ablación	49	16/4/2009	Botón	x	11/05/2009	26	6.2
Ablación	50	16/4/2009	Botón	x			

TRATAMIENTO EXPERIEMENTAL CON MEMBRANA									
Membrana		Fecha de marcaje	Estado	Protección	Estado de la membrana		Fecha de colecta	Días	Diámetro de fruto mm
Membrana	1	04/09/2009	Antesis	x	ok	Lista			
Membrana	2	04/09/2009	Botón	x	ok	Lista	11/05/2009	33	4.44
Membrana	3	04/06/2009	Antesis	x	ok	Lista			
Membrana	4	04/06/2009	sin datos	°	ok	Ausente			
Membrana	5	04/06/2009	sin datos	x	ok	Lista	18/05/2009	43	5.88
Membrana	6	04/06/2009	sin datos	x	ok	Lista	11/05/2009		
Membrana	7	04/06/2009	Antesis	x	ok	Lista	16/04/2009	10	4.56
Membrana	8	04/06/2009	Botón	x	regular				
Membrana	9	04/06/2009	Botón	x	ok	Lista	16/04/2009	10	4.3
Membrana	10	04/09/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	11	04/06/2009	Botón	x	ok	Lista	11/05/2009	36	9.41
Membrana	12	04/06/2009	sin datos	x	ok	Lista			
Membrana	13	04/06/2009	sin datos	x	ok/ duda	Duda			
Membrana	14	04/06/2009	Botón	°	ausente	Ausente			
Membrana	15	04/06/2009	Botón	x	ok	Lista	20/04/2009	14	4.7
Membrana	16	04/09/2009	Botón	x	ok	Lista	11/05/2009	33	8.84
Membrana	17	04/09/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	18	04/09/2009	Antesis/botón	°	ausente	Ausente			
Membrana	19	04/09/2009	Antesis	x	ok	Lista	11/05/2009	33	6.34
Membrana	20	04/09/2009	Botón	x	ok	Abortada			
Membrana	21	04/09/2009	Botón	x	ok/muerta	Lista			
Membrana	22	04/09/2009	Antesis	x	ausente	Lista			
Membrana	23	04/09/2009	Antesis	x	ausente	Lista			
Membrana	24	04/09/2009	Antesis	x	ausente	Lista			
Membrana	25	04/09/2009	Botón	x	ausente	Lista			
Membrana	26	04/09/2009	Botón	x	regular	Lista			
Membrana	27	04/09/2009	Antesis/botón	x	ok	Lista			
Membrana	28	04/09/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	29	16/4/2009	Antesis	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	30	16/4/2009	Botón	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	31	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	32	16/4/2009	Botón	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	33	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	34	16/4/2009	Botón	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	35	16/4/2009	Antesis	x	ok	Lista	11/05/2009	26	5.95
Membrana	36	16/4/2009	Botón	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	37	16/4/2009	sin datos	x	ok	Lista			
Membrana	38	16/4/2009	sin datos	sin datos	ok	Pendiente			
Membrana	39	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	40	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	41	16/4/2009	sin datos	x	ok	Lista			
Membrana	42	16/4/2009	sin datos	x	ok	Lista			
Membrana	43	16/4/2009	sin datos	x	ok	Lista	11/05/2009	26	5.02
Membrana	44	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	45	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	46	16/4/2009	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	47	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	48	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista	11/05/2009	26	4.82
Membrana	49	20/04/2009	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	50	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	51	20/04/2009	sin datos	sin datos	sin datos	Lista			
Membrana	52	16/4/2009	Botón	sin datos	sin datos	Lista			

Membrana	53	20/04/2009	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	54	20/04/2009	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	55	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	56	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	57	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	58	16/4/2009	Botón	sin datos	sin datos	sin datos			
Membrana	59	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			
Membrana	60	16/4/2009	Botón	x	ok	Lista			

MUESTRAS CONTROL CON POLINIZACIÓN LIBRE

Control		Fecha de marcaje	Estado	Protección	Fecha de colecta	Días de Marcaje	Diámetro de fruto mm
Control	1	04/06/2009	sin datos	x	16/04/2009	10	3.82
Control	2	04/06/2009	sin datos	x	11/05/2009	36	9
Control	3	04/06/2009	sin datos	x			
Control	4	04/06/2009	sin datos	x			
Control	5	04/06/2009	sin datos	x			
Control	6	04/06/2009	sin datos	x			
Control	7	04/06/2009	sin datos	x	16/04/2009	10	4.21
Control	8	04/06/2009	sin datos	x	16/04/2009	10	4.62
Control	9	04/06/2009	Antesis	x			
Control	10	16/4/2009	Antesis	x			
Control	11	04/09/2009	Antesis/oxidado	x			
Control	12	04/09/2009	Antesis/oxidado	x			
Control	13	04/09/2009	Antesis	x			
Control	14	04/09/2009	Antesis	x			
Control	15	04/09/2009	Antesis/oxidado	x			
Control	16	04/09/2009	Antesis/oxidado	x			
Control	17	04/09/2009	sin datos	x	11/05/2009	33	8.2
Control	18	04/09/2009	sin datos	x	11/05/2009	33	9.54
Control	19	04/09/2009	Antesis/oxidado	x			
Control	20	04/09/2009	Antesis/oxidado	x			
Control	21	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	22	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	23	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	24	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	25	16/4/2009	antesis/oxidado	x	11/05/2009	26	3.55
Control	26	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	27	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	28	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	29	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	30	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	31	16/4/2009	antesis/oxidado	x	11/05/2009	26	4.07
Control	32	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	33	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	34	16/4/2009	antesis/oxidado	x	18/05/2009	33	10.17
Control	35	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	36	16/4/2009	antesis/oxidado	x	18/05/2009	33	5.88
Control	37	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	38	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	39	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	40	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	41	16/4/2009	antesis/oxidado	x			

Control	42	16/4/2009	antesis/oxidado	x			
Control	43	16/4/2009	Antesis	x			
Control	44	16/4/2009	sin datos	x			
Control	45	16/4/2009	Antesis	x			
Control	46	16/4/2009	Botón	x			
Control	47	16/4/2009	Antesis	x			
Control	48	16/4/2009	Botón	x			
Control	49	16/4/2009	Antesis	x			
Control	50	16/4/2009	sin datos	sin malla			
Control	51	16/4/2009	Antesis	x			
Control	52	16/4/2009	Antesis	x			
Control	53	20/04/2009	Oxidado	x			
Control	54	20/04/2009	Oxidado	x			
Control	55	20/04/2009	sin datos	x			
Control	56	20/04/2009	sin datos	x			
Control	57	20/04/2009	Oxidado	x			
Control	58	20/04/2009	Oxidado	x			
Control	59	20/04/2009	Oxidado	x			
Control	60	20/04/2009	sin datos	x			
Control	61	20/04/2009	sin datos	x			
Control	62	20/04/2009	Oxidado	x			
Control	63	16/4/2009	Antesis	x			
Control	64	16/4/2009	Antesis	x			
Control	65	16/4/2009	Antesis	x	11/05/2009	26	7.64
Control	66	16/4/2009	Antesis	x			
Control	67	16/4/2009	Antesis	x			
Control	68	16/4/2009	Antesis	x			
Control	69	16/4/2009	Antesis	x			
Control	70	16/4/2009	Antesis	x	11/05/2009	26	9.22