



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Biología reproductiva de *Peperomia
campyloptropa* Hill. (Piperaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

NADIA CASTRO CÁRDENAS

TUTORA

DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

MÉXICO, D. F.

2014





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.

1. Datos del alumno
Castro
Cárdenas
Nadia
044 55 49 65 78 90
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306004469
2. Datos del tutor.
Dra. Sonia
Vázquez
Santana
3. Datos del sinodal 1.
Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán
4. Datos del sinodal 2.
Dra.
Silvia
Espinosa
Matías
5. Datos del sinodal 3.
M en C.
Karina
Jiménez
Durán
6. Datos del sinodal 4.
M. en C.
Ramiro
Cruz
Durán
7. Datos del trabajo escrito
Biología reproductiva de *Peperomia campylotropa* Hill. (Piperaceae)
63p.
2014

*A esa gran persona que me dio la vida, que me ha alentado a salir adelante a pesar de la adversidad, que ha estado en las buenas como en las malas, que me ha ayudado a comprender que el mundo es más grande que un vaso de agua, que me ha visto llorar y reír y volver a llorar, que no deja que nadie me dañe, que me si soy lo que soy es gracias a ella, en verdad este trabajo es tanto tuyo como mío
muchísimas gracias **MAMÁ**.*

A mi hermana Lorena que fue como una segunda madre, madrastra gracias por cuidarme.

A mis amigos de la Facultad que se volvieron parte de mi familia, con los que viví mañanas, tardes y noches : Marcela, Óscar Chu, Mau, David, Ferreira, Iván, Pamelita, Carito, Colunga.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Anabel, Ana montaña, Violetita, Javier Andrés, Bell, Moni, Rich, Monse, Aldebaran, Rocío, Almita, Ulises y los que me faltaron lo siento....

*Por último pero no menos importante a ti **Carlos**, que me has ayudado desde que te conozco, que me conoce mejor que nadie, que me sostiene la mano en cualquier momento, que se ha convertido en mi persona favorita, que me ha hecho crecer, que me hace llorar y reír y que indudablemente me hace feliz y sobre todo que me ama como nadie en este mundo gracias por darme el último empujón para terminar este trabajo al que no le veía fin gracias Trampis te amo.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me proporcionó durante mi formación como buena universitaria.

Al taller de “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”. Esta investigación se realizó en el laboratorio de Desarrollo en Plantas, Facultad de Ciencias, UNAM.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana directora de esta tesis, por el gran apoyo que me ha brindado y por transmitirme un poco de su pasión por las plantas que ha hecho que me enamore de ellas eternamente.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías, a la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, a la M. en C. Karina Jiménez Durán y al M. en C. Ramiro Cruz Durán, por sus valiosas correcciones y sugerencias en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Margarita Collazo Ortega por brindarme su amistad, sus consejos y aquellas grandes discusiones que nos divertían tanto, gracias “Mague”....

A la Dra. Silvia Espinosa Matías del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias, por la toma de fotografías. Gracias por su paciencia, consejos y aportaciones durante la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco y al M. en C. Ricardo Wong, por su infinita paciencia para enseñarme las metodologías utilizadas en la realización de esta tesis, muchas gracias.

A Gabriel Orozco Hoyuela de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología, UNAM, por la toma de fotografías y las imágenes de microscopía confocal.

A la M. en F.P. Ana Isabel Bieler Antolín del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, por la toma de microfotografías.

A la Dra. María Felix Ramos Ordoñez por sus correcciones en el manuscrito de esta tesis.

Al M. en C. Aldebaran Camacho Velázquez, a la Biól. Anabel Álvarez Porebska y al Biól. David Torres Sánchez, por su ayuda en la colecta del material biológico.

*A esas personas que se me adelantaron y ahora son estrellas de la
noche.....*

*La mente que se abre a una nueva idea,
jamás volverá a su tamaño original*

Albert Einstein

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	4
Orden Piperales.....	4
Embriología del género <i>Peperomia</i>	6
Biología reproductiva de Piperaceae.....	10
Objetivos.....	13
Materiales y métodos.....	14
Sistema de estudio.....	14
Zona de colecta	15
Observaciones de fenología y visitantes florales.....	15
Recolecta y fijación del material biológico para análisis morfológico y anatómico	16
Viabilidad de los granos de polen.....	16
Sistemas de cruzas.....	16
Observación de tubos polínicos.....	17
Procesamiento para el análisis histológico y micromorfológico.....	18
Deshidratación.....	18
Inclusión en LR-White.....	18
Inclusión en Paraplast.....	19
Pruebas histoquímicas.....	19
Rojo “O” de aceite.....	19
Azul negro de naftol-APS.....	19
Resultados.....	20
Discusión.....	45
Conclusiones.....	54
Literatura consultada.....	55
Anexo 1.....	61

RESUMEN

La importancia de la familia Piperaceae radica en la peculiaridad de su saco embrionario, el cual es tetraspórico. Esta condición ha sido estudiada por mucho tiempo y de ello se tienen varios reportes, algunos ratificados como correctos y otros como erróneos, llevando a la conclusión de que la configuración final de los sacos embrionarios requiere ser revisada en aquellos trabajos que no muestren las evidencias concretas al respecto.

Se colectaron inflorescencias de *Peperomia campyloptropa* con flores en diferentes etapas de desarrollo, desde botones florales, flores en antesis y diversas etapas de frutos. El material biológico se incluyó en resina plástica LR-White o en Paraplast; se tiñó con safranina-verde-rápido, azul de toluidina, azul de anilina, naranja de acridina o diversas técnicas histoquímicas. La observación morfológica e histológica se realizó mediante diversos tipos de microscopía.

Los resultados mostraron que las flores de la espiga maduran asincrónicamente, de la base hasta el ápice, donde se encuentra el meristemo de la inflorescencia. Las flores en la inflorescencia tienen un arreglo en espiral y cada una está cubierta por una bráctea acuminada, carecen de perianto y tienen simetría bilateral. El androceo está compuesto por dos estambres de filamentos anchos y cortos, los cuales sostienen a anteras biesporangiadas, monotecas y basifijas. La meiosis de las células madre de las microsporas es simultánea y se observaron cuatro tipos de tétradas. Los granos de polen son pequeños, miden 10-12 μm , son bicelulares, inaberturados y con exina microequinada-rugulada. El gineceo unicarpelar se ubica entre los dos estambres, y está compuesto por un ovario, estilo y estigma. El estilo es sólido, el estigma es de tipo seco y papiloso. Se observaron células secretoras (glándulas de aceite) a lo largo del estilo y ovario y tricomas glandulares sobre las brácteas y a lo largo del raquis de la inflorescencia, las cuales se rompen cuando el estigma es receptivo, sugiriendo una función como osmóforos, que pueden atraer a los polinizadores. El ovario es globoso y tiene un óvulo ortótropo de placentación basal, casi sésil. La célula madre de la megaspora entra en meiosis, pero sin la formación de paredes celulares. Los cuatro núcleos resultantes forman el saco embrionario tetraspórico. La configuración del saco embrionario difiere de las demás especies de *Peperomia* estudiadas.

En el presente trabajo se demuestra que *P. campyloptropa* presenta un saco embrionario del tipo Peperomia, el cual es variable en cuanto al número de células que lo constituyen, lo cual repercute en la ploidía del endospermo. Se debe continuar con las investigaciones en el género y la familia Piperaceae, para inferir si es que la tetrasporia representa una característica derivada o si a partir de este clado pudieron surgir todos los demás sacos embrionarios que se presentan en las angiospermas.

INTRODUCCIÓN

El género *Peperomia* comprende aproximadamente 1600 especies en todo el mundo (Samian *et al.*, 2009), por lo que es uno de los 10 géneros con más especies dentro de las angiospermas (Frodin, 2004). Forma parte del orden Piperales, donde se observan todos los tipos de crecimiento y formas de vida como: geófitas, hierbas, plantas suculentas, parásitas, lianas, arbustos, árboles y epífitas (Guillermo, 2002; Samain *et al.*, 2009). Además presentan diferentes especializaciones en cuanto a su morfología floral y síndromes de polinización (Samain *et al.*, 2009). Este grupo de plantas es nativo de América tropical y subtropical (Short y Cowie, 2011).

Las especies del orden Piperales presentan flores carentes de perianto, lo cual facilita los estudios ontogenéticos que permiten proponer posibles modelos de patrones de evolución floral (Tucker *et al.*, 1993; Jaramillo *et al.*, 2004). En este orden se ha observado que existen caracteres florales estables principalmente en el género *Peperomia*. En este género la morfología floral se repite en las especies estudiadas, mostrando poca variación, al igual que la posición de la bráctea que sostiene a los órganos florales y el desarrollo de sus hojas peltadas. A pesar de esto, se ha encontrado en *P. fraseri* variación morfológica en la bráctea y en la identidad floral con respecto al resto de las especies de *Peperomia* (Remizowa, 2005). Sin embargo se consideran como un evento raros, ya que estas características se consideran altamente estables en Piperales.

El género *Peperomia* es de gran interés hortícola; varias especies son cultivadas y explotadas comercialmente como plantas ornamentales (Hickey y King, 1981); en medicina tradicional se ha usado con fines terapéuticos por la cantidad de compuestos

químicos que se han extraído de algunos de sus taxa (Guillermo *et al.*, 2005; Aguilar, 2007).

En el presente trabajo además de la embriología y la morfología floral, se indagó sobre los aspectos de la biología floral no conocida de *Peperomia campyloptropa* Hill. Se examinaron los sistemas de cruce utilizados por esta especie, así como los posibles polinizadores y la interacción polen-pistilo. Se enfatizó sobre el desarrollo del saco embrionario, considerando un carácter controversial dentro de la familia Piperaceae e incluso en el orden Piperales, ya que en éste se presentan seis de los 10 tipos de sacos embrionarios reportados como tetraspóricos. Se discute la posible función de las estructuras secretoras del ovario, del raquis y de la bráctea, pocas veces mencionado en las especies estudiadas.

ANTECEDENTES

El orden Piperales se compone de cinco familias, *Lactoridaceae*, *Aristolochiaceae*, *Hydnoraceae*, *Saururaceae* y *Piperaceae* (Madrid y Friedman, 2010; Tabla 1). De estas cinco, la familia *Piperaceae* está conformada por especies herbáceas perennes o raramente anuales, arbustos y pequeños árboles. Se encuentra dividida en cinco géneros, *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Piper* y *Peperomia*. Tanto el género *Peperomia* como *Piper*, presentan un gran número de especies, considerándose como de los más diversos dentro de las angiospermas (Samain, 2008).

Las inflorescencias características del género *Peperomia* son espigas solitarias o agrupadas, con brácteas orbiculares o elípticas, con flores pequeñas, verdes o verde-amarillentas, generalmente bisexuales (Trelease, 1922; Tucker, 1980). Las flores de *Piperaceae* carecen de perianto y pueden o no presentar una bráctea protectora (Trelease, 1922; Tucker, 1980; Hickey y King, 1981; Tebbs, 1993; Short y Cowie, 2011).

Previo a la ontogenia floral de *Peperomia metallica*, *P. rubella* y *P. pellucida* las inflorescencias desarrollan una bráctea foliosa que protegerá a cada flor, siendo los estambres los primeros en diferenciarse, seguidos por el carpelo (Tucker, 1980).

El androceo está formado por dos estambres de filamentos cortos y anteras oblongas-transversas o subglobosas (Tebbs, 1993). El gineceo consiste de un ovario con estigma lateral o terminal no bifurcado (Trelease, 1922; Calderón, 1969; Guillermo, 2002; Samian, 2008), con óvulos ortótropos y unitégmicos que contienen un saco embrionario central (Johnson, 1900).

Tabla 1. Características más importantes de los cinco géneros de Piperaceae y de las cuatro familias de Piperales (tomado de Samian, 2008).

Familias	Piperaceae					Saururaceae	Aristolochiaceae		Lactoridaceae	Hydnoraceae
Géneros	<i>Verhuellia</i>	<i>Manekia</i>	<i>Zippelia</i>	<i>Piper</i>	<i>Peperomia</i>	4 géneros	Aristolochioideae	Asaroideae		
N° de especies	3	4-5	1	Aprox. 2000	Aprox. 1600	6 especies	5 géneros/ 500 especies	2 géneros/ 85 especies	1 género/ 1 especie	2 géneros/ 7 especies
Distribución	Cuba e isla La Española	América Central y del Sur	Suroeste de Asia	Pantropical Diversidad en America y Asia	Pantropical con mayor diversidad en América	Este de Asia y Norte de América	Tropical Cálido	Holártico	Islas Juan Fernandez (Chile)	África y sur de América
Forma de vida	Perenne	Perenne	Perenne	Perenne	Perenne	Perenne	Perenne	Perenne	Perenne	Perenne
Forma de crecimiento	Terrestre; herbácea	Terrestre; Escalador de raíces	Terrestre; Pequeños arbustos	Terrestre, pequeños arbustos, lianas.	Epifitas a terrestres; herbáceas	Terrestres (en ocasiones acuáticas), herbáceas	Terrestre, herbáceas o leñosas	Terrestres. herbáceas	Terrestres, arbustivas	Terrestres, herbáceas
Perianto	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
Androceo	2 estambres Tetrasporangiados	4 estambres Tetrasporangiados	6 estambres Tetrasporangiados	(1-)2-6(-10) estambres Tetrasporangiados	2 estambres Bisporangiados	3-8 estambres adnados al gineceo. Tetrasporangiados	5-40 estambre, pero generalmente 6-12, basalmente adnados al gineceo	12 estambres	6 estambres basalmente adnados al gineceo	(2)3 o 4(5) estambres biesporangiados basalmente connados
Gineceo	3-4 Carpelos Ovario unilocular	4-5 Carpelos Ovario unilocular	3-4 Carpelos Ovario unilocular	2-4 Carpelos Ovario unilocular	1-2 Carpelos Ovario unilocular	3-4 Carpelos Ovario unilocular	4 o 6 carpelos en un ovario locular	6 carpelos apocárpicos fusionados	3 carpelos basalmente connados	3- 4(5) carpelos en un ovario unilocular
N° de óvulos	1	1	1	1	1	1-2	-	-	-	-
N° de tegumentos	1	2	2	2	1	2	-	-	-	-
Polen	Inabertura do	Monosulcado	Monosulcado	Monosulcado	Inabertura do	Monosulcado, tricomonosulcado	Inaberturado	Inaberturado poliforado a policolpado	Monosulcado	Monosulcado (<i>Hydnora</i>) Trisulcado a tricomonosulcado (<i>Prosopanche</i>)
Fruto	Drupa	Drupa	Drupa	Drupa	Drupa	Cápsula	Cápsula	Cápsula o folículo	Folículo	

El saco embrionario, también conocido como gametofito femenino o megagametofito está formado por un número reducido de células que dependen del esporofito para su protección, nutrición y funcionamiento. Considerando el número de núcleos haploides que le dan origen existen tres grupos principales de desarrollo de saco embrionario: monospóricos, bispóricos y tetraspóricos originándose respectivamente de uno, dos o cuatro núcleos de la tétrada de megasporas.

Los sacos embrionarios maduros se caracterizan por la variación en el número final de las células que lo componen y su ploidía, siendo los de tipo tetraspórico los más diversos como se ejemplifica en la figura 1 (Maheshwari, 1937; 1950; Davis, 1966; Reiser y Ficher, 1993; Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013). El desarrollo y características de cada uno de ellos se ejemplifican en el Anexo 1.

Se ha reconocido que el orden Piperales presenta 6 de los 10-11 tipos de sacos embrionarios (Maheshwari, 1950), incluyendo monospóricos, bispóricos y tetraspóricos (Madrid y Friedman, 2009). Por esta razón Madrid y Friedman (2010), reportan que la mayor diversidad y la posible diversificación de sacos embrionarios en las angiospermas, ocurrió en la familia Piperaceae y que el posible ancestro de este tipo de sacos embrionarios es el tetraspórico tipo Drusa.

Campbell (1902, citado en Arias y Williams, 2008) sugirió que los gametofitos femeninos tetraspóricos con 16 núcleos de Piperaceae representaban al tipo ancestral de las angiospermas, ya que son intermedios entre los gametofitos femeninos relativamente grandes de todas las gimnospermas y el tipo *Polygonum* altamente reducido compuesto por ocho núcleos presente en la mayoría de las angiospermas. Por lo tanto las Piperaceae se consideran haber originado de un grupo basal de angiospermas. La otra idea alternativa fue planteada por Johnson (1904, citado en Arias y Williams, 2008) y apoyada

más tarde por Williams y Friedman (2004), en ella se considera que los sacos embrionarios tetraspóricos de Piperaceae se originaron de un saco embrionario monospórico tipo *Polygonum*.

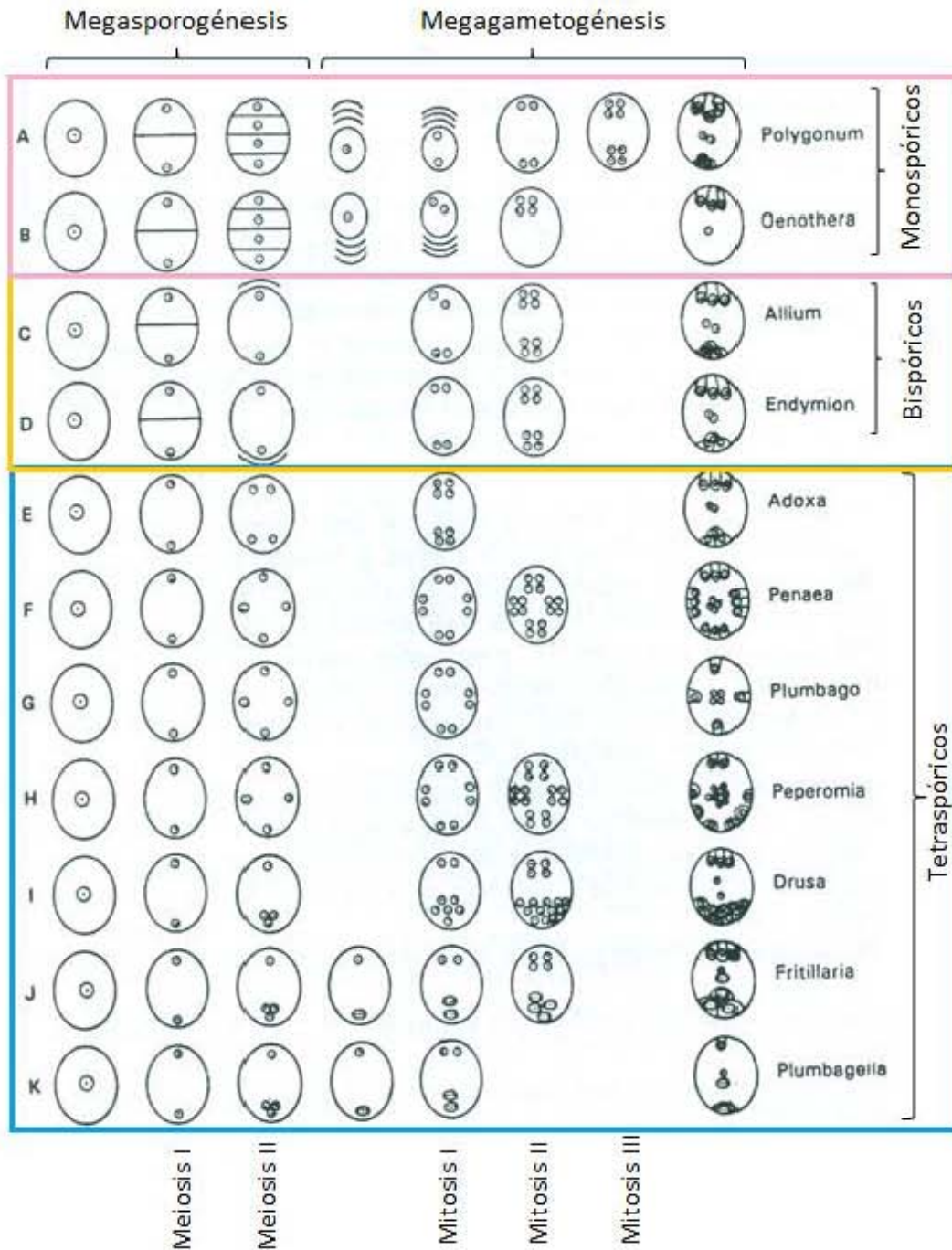


Figura 1. Tipos de sacos embrionarios (Tomado de Bhojwani, 2000).

En la familia Saururaceae del orden Piperales (Arias y Williams, 2008; Madrid y Friedman, 2010), se presentan tanto sacos embrionarios monospóricos del tipo Polygonum (en *Houttuynia*) como bispóricos (en *Saururus* y *Anemopsis*). En cuatro de los cinco géneros de Piperaceae (excepto *Verhuellia*) todos los sacos embrionarios son tetraspóricos, pero de diferentes tipos. El tipo Drusa se presenta en los géneros *Manekia* y *Zippelia*; el tipo Fritillaria en *Piper* y el tipo Peperomia en *Peperomia* (Fig. 2; Madrid y Friedman, 2009). En *Manekia naranjoana* también ha sido reportado el tipo de saco embrionario tipo Penaea (Arias y Williams, 2008). En recientes filogenias moleculares el género *Verhuellia* es la rama basal de Piperaceae, pero aún no se conoce el tipo de saco embrionario (Arias y Williams, 2008), pero los datos morfológicos anatómicos y del desarrollo apoyan su posición basal (Samain *et al.*, 2010).

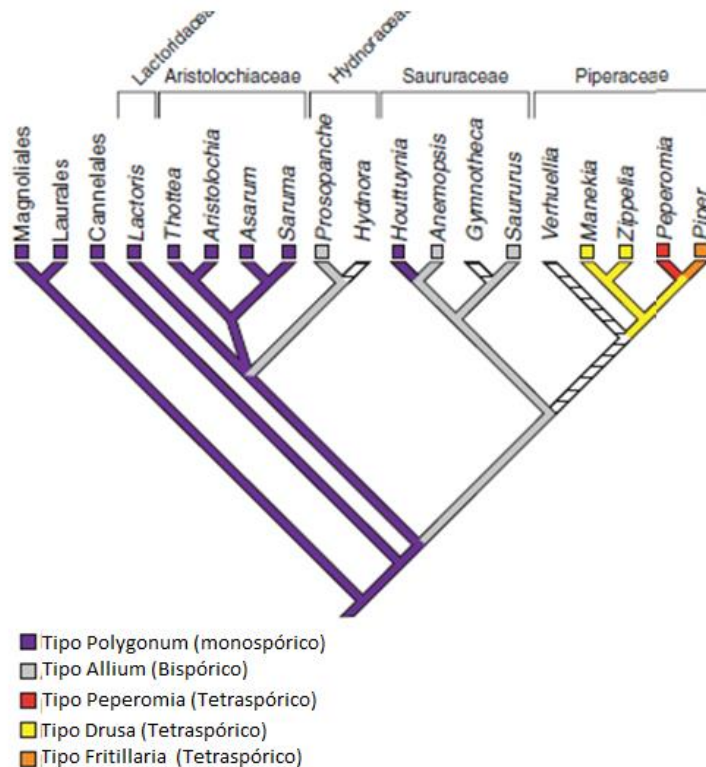


Figura 2. Sacos embrionarios presentes en las familias de Piperales (tomado de Madrid y Friedman, 2009).

Las primeras revisiones comparativas sobre los gametofitos femeninos del género *Peperomia*, indicaban que el saco embrionario más común era el compuesto por nueve células: una sinérgida, una ovocélula, seis antípodas y una célula central con ocho núcleos tal como fue descrito para *P. pellucida* por Johnson (1900) y fue reportado en cerca de una decena de especies (Maheshwari, 1950).

En estudios más recientes se ha demostrado que el saco embrionario más común en *Peperomia*, se encuentra compuesto por 10 células: dos sinérgidas, una ovocélula, una célula central con ocho núcleos y seis células periféricas/antípodas (Gvaladze y Akhalkatsi, 1998; Madrid y Friedman, 2010).

Las células que conforman el gametofito femenino maduro tipo *Peperomia* en el género *Peperomia* es variable en cuanto a las sinérgidas, antípodas/células periféricas y célula central. En el caso de las sinérgidas puede ir desde cero hasta cuatro células (Martinoli, 1948); de igual forma el número de células antípodas (o periféricas) va desde cero hasta 11 (Johnson, 1914; Martinoli, 1948).

En *Peperomia hispidula* el saco embrionario es tricelular, formado por una ovocélula, una sinérgida y una célula central con catorce núcleos. En *P. dolariformis* el saco embrionario contiene 10 células, arregladas en dos sinérgidas, una ovocélula, seis células periféricas y una célula central con siete núcleos (Madrid y Friedman, 2010). Mientras que el saco embrionario de *Peperomia pellucida*, presenta 16 núcleos, repartidos en dos sinérgidas, una ovocélula, célula central con nueve núcleos y cerca de seis células accesorias (Nikiticheva, 1981; Nikiticheva *et al.*, 1981; en Madrid y Friedman, 2010).

Con respecto al fruto de las especies de Piperaceae estudiadas, éste se ha descrito como diminuto, carnoso y del tipo drupa con pericarpio delgado, con una sola semilla esférica por fruto, con endospermo escaso y abundante perispermo almidonoso (Martínez-

Colín *et al.*, 2006; Madrid y Friedman, 2010). Al momento de la dispersión de la semilla el embrión es rudimentario (Martínez-Colín *et al.*, 2006). Aunque los caracteres seminales y del fruto podrían ser de gran utilidad en la delimitación de nuevas especies descritas, existe poca información al respecto (Arias y Williams, 2008).

Algunas especies de la familia Piperaceae son monoicas, con flores masculinas y femeninas; o bien androdioicas, con individuos masculinos e individuos hermafroditas (Figueiredo y Sazima, 1999). Las especies como *Piper amalago* (Lei y Lian, 1998) y *Pi. capense*, son hermafroditas, más similares en hábito (arbustivo) y forma floral a especies del Neotrópico (Smith *et al.*, 2008).

Sin embargo también se ha mencionado que algunas especies son dioicas, como *Pi. polysyphorum*, *Pi. bavinum*, *Pi. pedicellatum* y *Pi. pubicatum* (Lei y Lian, 1998) o como las especies de África *Pi. guineense*, o como la mayoría de las especies del sureste de Asia (Smith *et al.*, 2008). En la mayoría de las especies de Piperaceae se desconoce aun su biología reproductiva.

Se ha planteado que la polinización en la familia Piperaceae se realiza principalmente por medio del viento y en ocasiones por el agua, debido a que las plantas son de talla corta y las flores están agrupadas en inflorescencias de tipo espiga (Semple, 1974). Sin embargo, en especies del Sureste de Brasil la polinización se ha relacionado a coleópteros, dípteros y hemípteros asociados con las inflorescencias de algunas especies de *Piper* (de Figueiredo y Sazima, 1999), pero se desconocen los polinizadores del resto de los géneros y de *Peperomia* en particular.

A pesar de que la mayoría de las especies de la familia son hermafroditas, éstas evitan la autofecundación mediante la dicogamia (separación temporal entre la liberación del polen y la receptividad del estigma) y en ausencia de polinización se ha observado que

algunas especies no producen frutos. Lo cual también ha sido atribuido a un sistema de autoincompatibilidad (de Figueiredo y Sazima, 1999), pero no existen reportes que lo comprueben.

Otra manera de reproducción en el género *Peperomia*, es la vegetativa, como en *Peperomia parnassifolia*, que se reproduce por medio de estolones y hojas fragmentadas cuyos pecíolos forman nuevas raíces al estar en contacto con el suelo y la humedad (de Souza *et al.*, 2009).

Mathieu *et al.* (2011) realizaron una revisión de especies géofitas de México, Guatemala, Perú y Bolivia en la cual se reorganizan más de 20 especies del género *Peperomia*. Encontraron que existen más de cinco especies para México. Consideran a *Peperomia campylotropa* Hill una sinonimia de *Peperomia bracteata*. Se determinó que para el Valle de México existen cinco especies (Fig. 3; Calderón, 1969; Molina-Paniagua y Zamudio, 2010). Para fines de este trabajo se considera como legítima especie a *Peperomia campylotropa*.

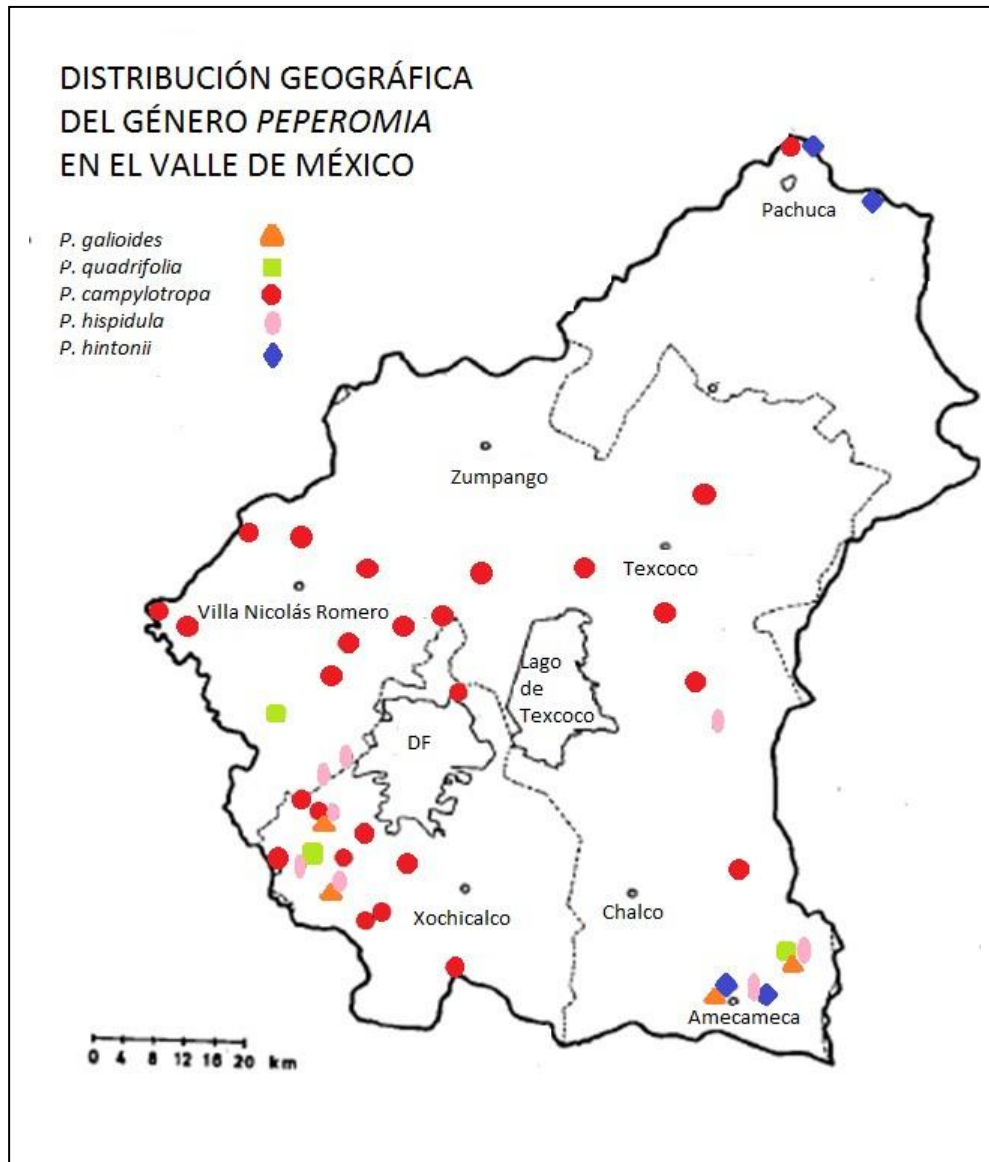


Figura 3. Distribución geográfica del género *Peperomia* en el Valle de México. (Tomado de Calderón, 1969).

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de la presente investigación es describir la biología floral que involucre tanto los sistemas de cruza, la morfología floral, la embriología y la polinización de *Peperomia campylotrapa*, en el Pedregal de San Ángel.

Objetivos particulares

1. Describir la morfología floral de *P. campylotrapa*.
2. Estudiar el desarrollo del ovario, óvulo y saco embrionario de *P. campylotrapa*.
3. Estudiar el desarrollo de la pared de la antera y describir el desarrollo, la morfología y la viabilidad del grano de polen.
4. Analizar los sistemas de cruza de *P. campylotrapa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio

Peperomia campylotropa es conocida comúnmente como ombligo de tierra o pimienta de tierra (Rzedowski, 1978). Es una especie herbácea con forma de vida rupícola, es decir, que crece sobre las rocas principalmente, aunque también se observaron individuos creciendo sobre tierra suelta. Se encuentra en pequeñas grietas, directamente sobre suelos sombreados y con alta humedad atmosférica. Su escasa talla y sus flores pequeñas e inconspícuas las hacen muy poco llamativas (Fig. 4A). Debido a los incompletos ejemplares de herbario (con flores, tubérculos, rizomas o estolones), la delimitación de las especies es muy compleja. *Peperomia campylotropa* es una especie registrada para el Pedregal de San Ángel (Rzedowski, 1978; Castillo *et al.*, 2007).

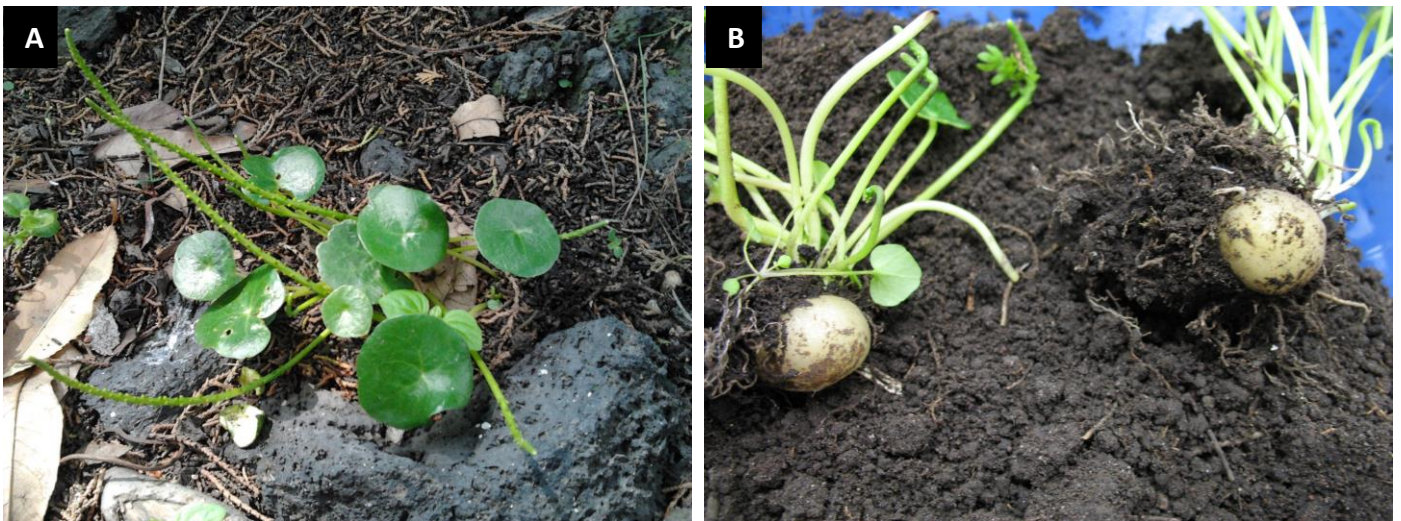


Figura 4. *Peperomia campylotropa*. A. Individuo creciendo sobre roca volcánica en el Pedregal de San Ángel. B. Ejemplares mostrando el tubérculo y raíces fibrosas.

Peperomia campyloptropa es una planta erecta, de 25 cm de alto aproximadamente, provista de un tubérculo globoso con raíces fibrosas (Fig. 4B). Las hojas son carnosas escasas o numerosas, salen del tubérculo y tienen pecíolos largos y delgados, los cuales se insertan en el centro del limbo de la hoja la cual es orbicular, de 1.5 a 3.5 cm de diámetro. Las flores se presentan en una inflorescencia de tipo espiga de 3 a 10 cm de largo por 1 mm de diámetro, de color claro, las flores son bisexuales y sésiles (Jonhson, 1900; Campbell, 1901; Castillo *et al.*, 2007), carecen de sépalos y pétalos, tienen dos estambres, un ovario, un estilo y un estigma. Cada flor tiene una bráctea ovalada y acuminada. El fruto es una drupa globosa-ovoide, verruculosa, de aproximadamente 1.5 mm de largo (Calderón, 1969; Castillo *et al.*, 2007).

Zona de colecta

Peperomia campyloptropa se colectó en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, localizada al suroeste de la ciudad de México, dentro del campus de la Universidad Nacional Autónoma de México (19°18'31''-19°19'17''N, 99°10'20''-99°11'52''O), a una altitud de 2200 a 2277 msnm. El clima de la zona es templado subhúmedo (Cb) con lluvias de verano, una temperatura media anual de 15.5 °C y una precipitación promedio anual de 835 mm. La lluvia se distribuye de manera diferencial, lo que permite distinguir dos épocas, la de lluvias, que va de junio a octubre y la de secas que abarca de noviembre a mayo (Sarukhán, 1997).

Observaciones de fenología y visitantes florales

A partir de mayo de 2011, 2012 y 2013 comenzaron a aparecer plántulas de *P. campyloptropa* y a partir de entonces se visitaron constantemente para conocer el periodo de floración, fructificación y los visitantes florales.

Recolecta y fijación del material biológico para el análisis morfológico y anatómico.

Se recolectaron inflorescencias con flores en distintas etapas de desarrollo de *P. campylotrapa* durante la temporada de lluvias (mayo a septiembre del 2011 y 2012). Los frutos se colectaron durante julio-octubre. Parte de las muestras fueron fijadas en FAA (formaldehído, alcohol etílico, ácido acético y agua destilada en proporción 5:1:0.5:3.5) (López *et al.*, 2005).

Viabilidad de los granos de polen

Para ello se utilizó el reactivo de Alexander. En un portaobjetos se diseccionaron anteras maduras, las cuales fueron disectadas, para obtener los granos de polen. Posteriormente se agregó una gota del reactivo de Alexander. Se cubrió con un cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico. Se contaron los granos de polen viables e inviables de las anteras.

Sistemas de cruza

Para realizar las polinizaciones se identificó bajo el microscopio estereoscópico el momento en el que las anteras fueran dehiscentes y el estigma fuera receptivo, lo cual se determinó por medio de la reacción de Peróxido de Hidrógeno y el cambio de coloración del estigma; ya que los estigmas receptivos tenían un color claro a comparación de los no receptivos que eran de un color más oscuro. Se realizaron cuatro tipos de polinizaciones.

- a) Polinizaciones cruzadas (xenogamia). Se emascularon entre 15-20 flores (se retiraron anteras indehiscentes de diferentes individuos), posteriormente a los estigmas que se encontraron receptivos (aquellos que sobresalieron de la bráctea que antes los protegía y que eran de color claro) se les colocó polen de

otras inflorescencias con la ayuda de un pincel. Se recolectaron los pistilos polinizados después de 48 h y se fijaron en FAA.

- b) Autopolinizaciones (geitonogamia). Se realizó este tipo de autopolinización, debido a que la maduración del polen y la receptividad del estigma se encuentran desfasados y no es posible efectuar autogamia. Se emascularon entre 14-15 flores. Se guardó el polen, para colocarlo en los estigmas receptivos de flores de la misma inflorescencia. Posteriormente recolectaron a las 48 h, y se fijaron en FAA.
- c) Polinizaciones abiertas. En plantas colectadas sin polinizar se observaron bajo el microscopio y en ellas se pudieron detectar animales recorriendo las inflorescencias
- d) Control para apomixis. Es un control que excluye polinización. Para ello algunas inflorescencias se observaron bajo el microscopio para remover los posibles insectos tanto de las inflorescencias y hojas, eliminando la mayoría del sustrato y solo dejando el tubérculo y raíces sobre recipientes con agua. Además las inflorescencias se mantuvieron cubiertas para evitar a cualquier visitante.

Observación de tubos polínicos por medio de fluorescencia

Pistilos polinizados se fijaron en FAA y se lavaron con agua destilada durante 10 min. Posteriormente se retiró el exceso de agua y se pusieron en NaSO₃ al 10% y en seguida colocaron en una esterilizadora, donde se mantuvieron a una temperatura de 105 °C y 0.2 bar de presión, por alrededor de 5 min. Posteriormente el material se enjuagó con agua destilada y se les adicionó azul de anilina decolorado al 1% en K₃PO₄ 0.1 N, el material se conservó, en total oscuridad 15 h aproximadamente. Transcurrido el tiempo, los gineceos

fueron macerados con la ayuda de un portaobjetos y un cubreobjetos y se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus Provis AX750, para evidenciar la calosa de los tubos polínicos. También se hicieron algunas reconstrucciones con microscopia confocal utilizando azul de anilina, naranja de acridina y DAPI.

Procesamiento para el análisis histológico y micromorfológico

Deshidratación. Después de permanecer una semana en el fijador (FAA), las muestras se lavaron en agua destilada, luego, se deshidrató en una serie de etanoles graduales (50%, 70%, 85%, 96% y al 100%), por un periodo de 1 a 1:30 h en cada concentración (López *et al.*, 2005). Al concluir la deshidratación se procedió a realizar la inclusión en LR-White y en Paraplast. Adicionalmente algunas muestras se prepararon para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido (MEB), fueron deshidratadas y posteriormente desecadas a punto crítico en una desecadora CPD-030 Baltec y fueron cubiertas con una capa de oro por medio de una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Posteriormente se realizaron observaciones en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV y se tomaron placas fotográficas.

Inclusión en LR-White. Después de la deshidratación los tejidos fueron embebidos en una mezcla de LR-White-Etanol 100% en una proporción 1:1, durante 24 h, para después pasarlos por LR-White puro por 24 h a 4°C. Una vez terminado el plazo, se incluyeron en cápsulas de gelatina para llevar a cabo la polimerización en una estufa a 56°C en ausencia de oxígeno por 12 h. Los bloques obtenidos se cortaron de 1 a 2 μm de grosor con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo RMC-MT990. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina (López *et al.*, 2005).

Inclusión en Paraplast. Después de la deshidratación los tejidos fueron embebidos en mezcla de paraplast-xilol en proporción 1:2 y 1:1 y en paraplast puro durante 24 h a 56°C en cada uno. Posteriormente se incluyeron en paraplast puro en moldes metálicos, dejándolos solidificar. Los cortes se hicieron a 7µm de grosor, en un micrótopo de rotación. Por último, se desparafinaron y algunos se tiñeron con safranina verde-rápido y en otros casos se realizaron diversas pruebas histoquímicas. En todos los casos las preparaciones se montaron con Entellan (López *et al.*, 2005).

Pruebas histoquímicas aplicadas

Rojo “O” de aceite (lípidos). Se colocaron varios botones florales recién colectados, en solución de rojo “O” de aceite, por 24 h, posteriormente se realizó un squash y se montaron con jalea glicerizada.

Azul negro de naftol-APS (proteínas y polisacáridos insolubles). Las muestras fueron desparafinadas e hidratadas hasta agua, para aplicar ácido peryódico durante 15 min, luego se lavaron con agua y se aplicó el reactivo de Schiff durante 15 min, se lavaron con agua, ácido acético al 2% durante un minuto para evitar la formación de cristales enseguida se enjuagaron con agua. Después se deshidrataron hasta etanol 50% y se aplicaron durante 5 min unas gotas de azul negro de narftol. Se deshidrataron rápidamente con butanol, por último se pasaron por xilol por 3 min y se montaron con Entellan.

RESULTADOS

Fenología de *Peperomia campylotrapa*

Durante las observaciones de campo se registró que las plantas de *Peperomia campylotrapa* comienzan a surgir a principios de mayo cuando inicia la temporada de lluvia. Se observó que la floración y fructificación es a partir de finales de mayo, la cual se extiende hasta mediados de octubre. Posteriormente comienzan a perder el follaje y lo único que seguirá para la próxima temporada de lluvias será un tubérculo globoso del cual emergerán las nuevas hojas e inflorescencias.

Los frutos contienen una semilla y al caer son depositados sobre el sustrato. Algunas semillas germinan y forman un pequeño tubérculo. Una vez que han emergido 2-3 hojas aproximadamente, surge del tubérculo el eje de la inflorescencia. Éste va creciendo y dejando en la parte basal los primeros botones florales que, serán los primeros que se fecundarán y formarán frutos (Fig. 5A).

Morfología de las inflorescencias

De las sesenta inflorescencias observadas de *P. campylotrapa* todas presentaron flores hermafroditas de color verdoso, las cuales carecen de sépalos y pétalos, pero cada flor tiene una bráctea foliosa acuminada que protege a los órganos sexuales durante su desarrollo (Fig. 5A). En los botones florales, las anteras y el estigma están separados espacialmente, siendo hercogámicos (Fig. 5B).

Las flores se distribuyen sobre la inflorescencia de manera espiralada, las más jóvenes están ápice cercanas al meristemo apical desnudo de la inflorescencia, mientras que las flores maduras se localizan hacia la base de ésta, por lo tanto, los frutos maduros

se ubican cercanos a la base de la inflorescencia, son de color café con respecto a la bráctea y los estambres colapsados son persistentes. Cada eje de inflorescencia forma aproximadamente 50 flores (Fig. 5A).

Conforme el gineceo va desarrollándose, los filamentos de las anteras se prolongan hacia el exterior de la bráctea, para liberar el polen, antes de que el estigma de la misma flor sea receptivo, por esta razón se considera que es una especie protándrica (Fig. 5B, flor de lado derecho). Cuando el estigma receptivo queda al descubierto, las anteras de esa misma flor ya han liberado el polen (Fig. 5C) por lo que es difícil la autogamia.

Para fines de este trabajo y debido a la ausencia de perianto, definimos *antesis* a la liberación del polen por anteras maduras, ya que el filamento de los estambres crece para exponer a las anteras dehiscentes, antes de que la bráctea deje al descubierto al estigma.

Durante la maduración de los botones florales, uno de los primeros sucesos es el alargamiento de los filamentos. Esto ocasiona que las anteras queden afuera de la bráctea para que el polen sea liberado. Posteriormente el gineceo se alarga y la bráctea deja al descubierto al estigma receptivo.

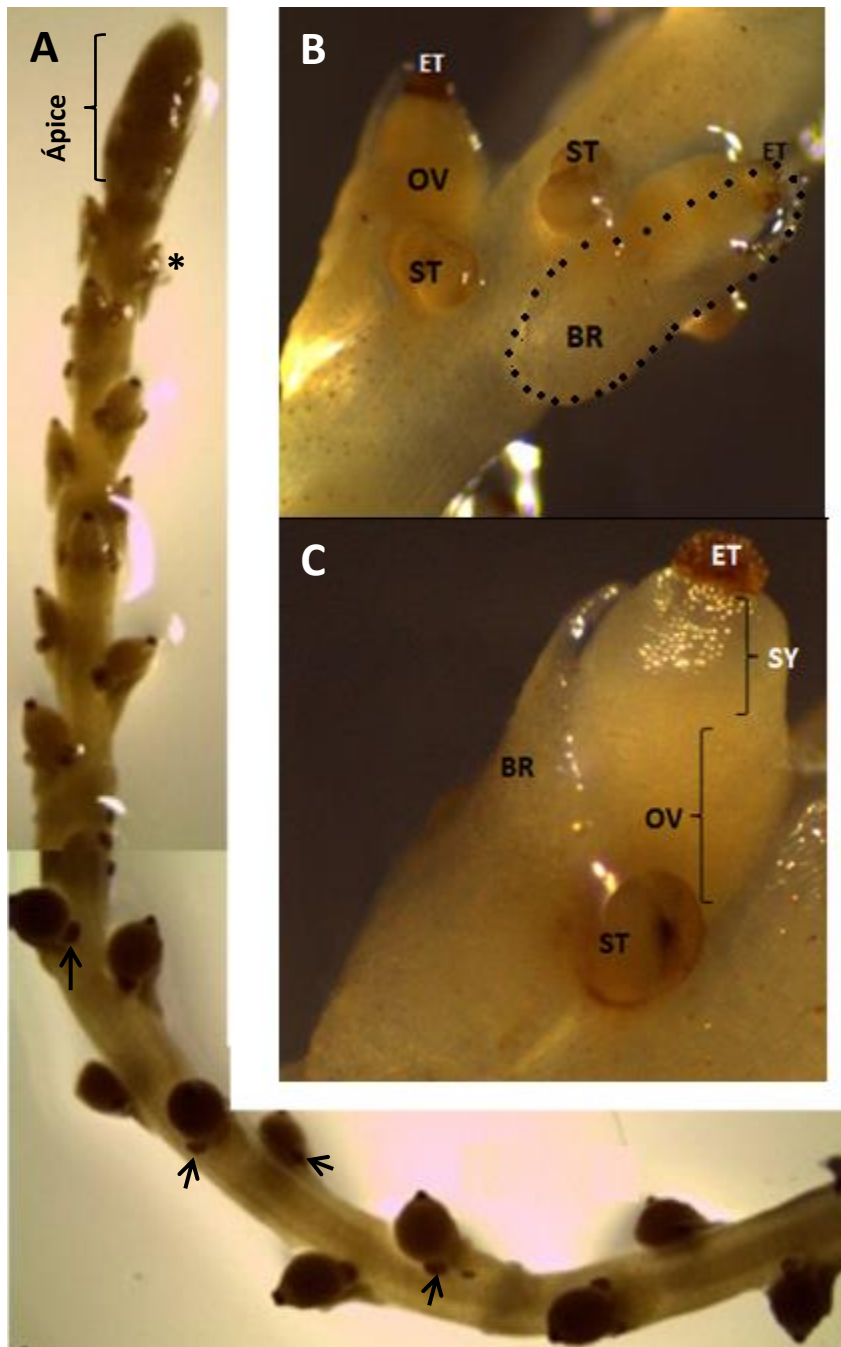


Figura 5. Inflorescencia tipo espiga y flores de *Peperomia campylotropa*. A. Inflorescencia de *P. campylotropa*, donde se observan botones florales en el ápice, flores en anthesis (*) y frutos en diferentes estados de desarrollo. Los estambres son persistentes (flechas) B. Acercamiento a dos flores de la inflorescencia, la flor de la izquierda con los estambres descubiertos por la bráctea. C. Flor en anthesis, conformada por androceo y gineceo. El gineceo ha terminado de crecer y ha desplazado a la bráctea para dejar al descubierto al estigma. BR-Bráctea; ET-Estigma; OV-Ovario; ST-Estambres; SY-Estilo.

Las brácteas que cubren a las flores en desarrollo tienen ápices alargados y debido a su inserción espiralada a lo largo de la inflorescencia, al ser vistas de frente tienen una apariencia en conjunto como una roseta, las flores se encuentran en desarrollo en la axila de cada una de ellas (Fig. 6A).

Al ser removidas manualmente las brácteas quedan al descubierto las flores en diversas etapas de desarrollo, las cuales carecen de perianto, cada una formada por un par de estambres y un gineceo apocárpico y unicarpelar. A lo largo del eje de la inflorescencia las flores jóvenes están en el ápice y las más maduras en el centro y base de la inflorescencia. En esta zona basal, las flores son de mayor tamaño que las del ápice, pero de igual tamaño a las brácteas que las cubren (Fig. 6B).

Sobre la epidermis del raquis en la parte media y basal de la inflorescencia se observaron tricomas glandulares y secretores constituidas por tres células, dos basales y una célula apical globosa, de apariencia reniforme y escultura lisa. La escultura de las células epidérmicas y de los estomas ciclocíticos del raquis es estriada (Fig. 6C).

Las glándulas globosas también se observaron en la epidermis adaxial de las brácteas florales, incluso en las más jóvenes (marcadas en la Fig. 6C con asteriscos) y cercanas al meristemo de inflorescencia apical, el cual tiene apariencia de domo y es desnudo (carente de bráctea; Fig. 6D).

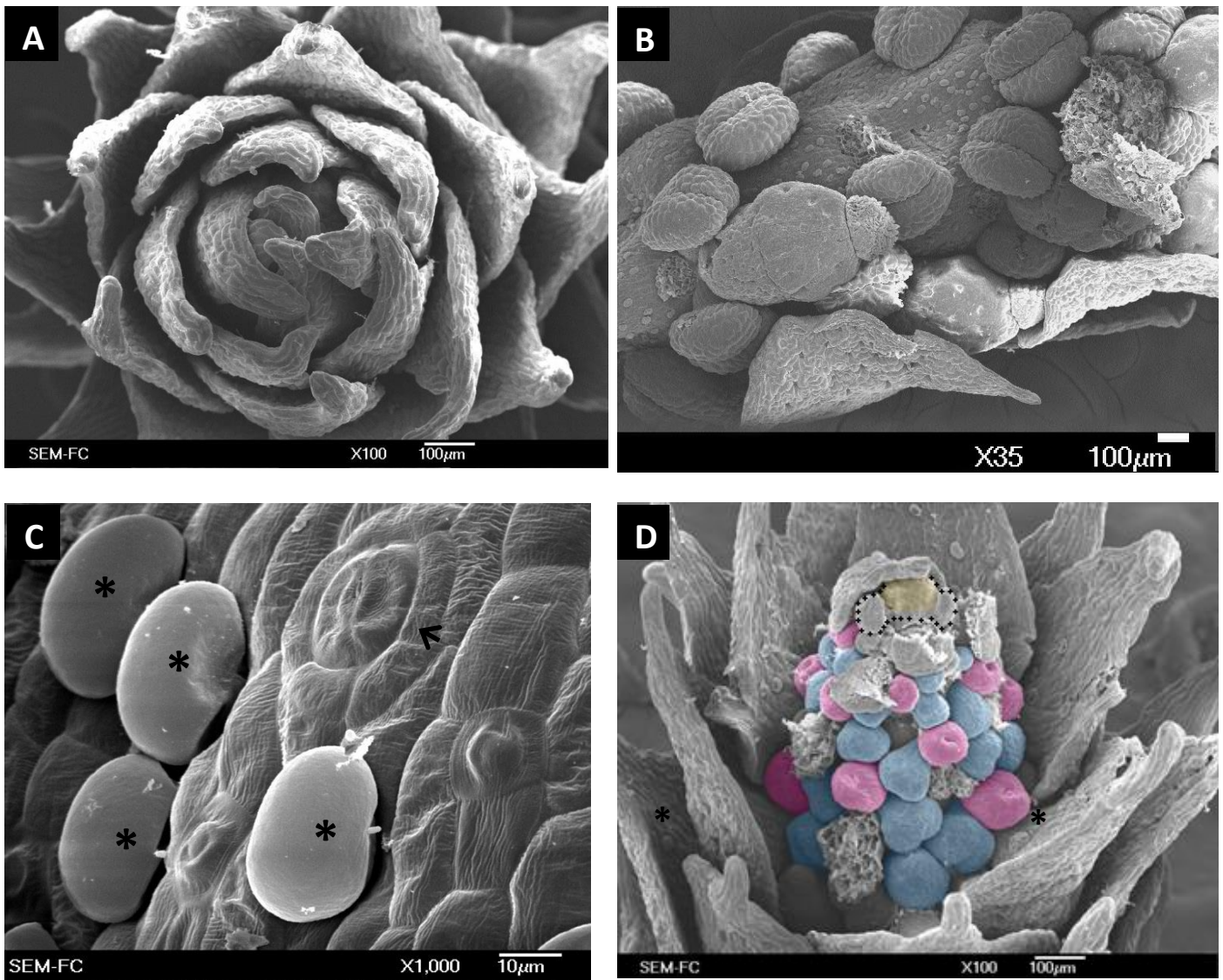


Figura 6. Morfología de la inflorescencia de *Peperomia campyloropa*. MEB. A. Ápice de la inflorescencia visto de frente, se observa el arreglo espiralado de las brácteas. El ápice de la bráctea es acuminado. **B.** Sección de una inflorescencia mostrando flores en diferente estado de desarrollo, las flores jóvenes se ubican a la derecha de la imagen y las etapas intermedias de la ontogenia a la izquierda. **C.** Acercamiento al raquis de la base de la inflorescencia mostrando estomas ciclocíticos (flecha) y varios tricomas glandulares, globosos (*). En esta zona se ubican las flores en antesis, las cuales, al igual que las brácteas fueron removidas. **D.** Ápice de la inflorescencia visto lateralmente. Las brácteas de frente fueron removidas, se observa el meristemo apical desnudo de la inflorescencia y con forma de domo (amarillo). Sobre las brácteas se observa tricomas a lo largo de éstas (*).

Morfología y anatomía floral

Cada flor de *P. campyloptropa* se diferencia del meristemo de la inflorescencia, ubicado en el ápice de ésta. Las flores desde el inicio tienen simetría bilateral. En cada primordio floral existen dos protuberancias estaminales laterales y son las primeras en aparecer. Posteriormente surge el primordio del gineceo en una posición central y ligeramente sobrepuesta a los primordios estaminales, es decir en posición frente a la bráctea (Fig. 6D, ver el ápice de la inflorescencia). Es un ovario que descansa sobre un receptáculo pobremente perceptible.

El primordio carpelar crece como un cilindro, dejando un hueco que marca el futuro lóculo del ovario y es ligeramente menor en talla con respecto a los dos estambres, en los cuales se va distinguiendo la antera, ya que toma una apariencia globosa (Fig. 7A, a la izquierda y punteado como botón floral 1). Una vez cerrado el ovario y el futuro estilo ensanchado, el carpelo crece desigualmente. La zona del carpelo más distal al eje de la inflorescencia y ubicado cerca de la bráctea crece un poco más rápido que en la zona opuesta (Figs. 7A, a la derecha y punteado como botón floral 2).

En el ápice de cada gineceo y una vez que se han diferenciado el ovario y el estilo cilíndricos, sobre este último se irá formando el estigma capitado. Mientras tanto el estilo va ensanchándose radialmente, incluso es de mayor diámetro y más largo que el ovario en desarrollo y sobre él se distingue el estigma. En esta etapa las anteras se distinguen monotecas y biesporangiadas y comienza a observarse una pequeña depresión a lo largo de la epidermis de cada par de esporangios, lo cual marca la iniciación de la línea de dehiscencia (Fig. 7B).

El gineceo sigue desarrollándose y aparecen sobre la superficie del estilo y del ovario depresiones epidérmicas, siendo más abundantes en la zona del ovario y va distinguiéndose la diferenciación de las papilas unicelulares del estigma. Posteriormente estas papilas del estigma van a alargándose, el estilo se ensancha y se diferencian perfectamente los osmóforos (células secretoras en posición subepidérmica), el estilo es mucho más ancho y largo que el ovario y tiene un mayor número de osmóforos. Las anteras descansan sobre un corto filamento, son rectas y con línea de dehiscencia extrorsa (Fig. 7D).

La flor madura en *antesis* muestra que las anteras se han movido lateralmente debido al ligero alargamiento del filamento para alejarlas de la bráctea que las cubre lateralmente y permitir la liberación de los granos de polen (Fig. 7D, flecha). El gineceo en esta etapa muestra un ovario más ensanchado que el estilo y con células globosas y abundantes depresiones epidérmicas. El estilo tiene células de apariencia más lisa y células aplanadas con respecto a aquellas del ovario. Las depresiones en las células epidérmicas son escasas. El estigma es de menor tamaño que el estilo, es papiloso y de tipo seco (Fig. 7E-H).

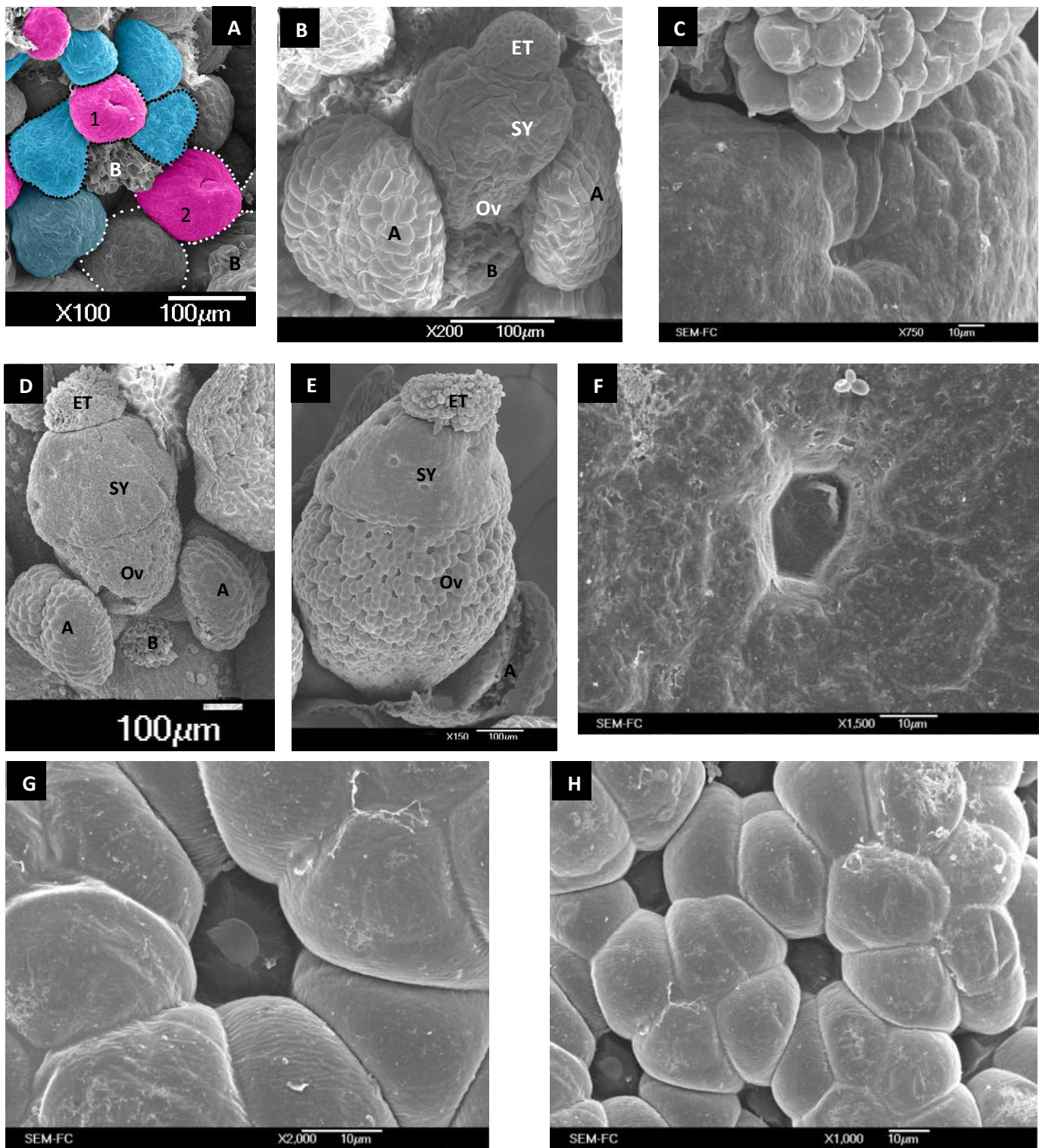


Figura 7. Morfología floral. A. Primordios florales en etapas diferentes (1, 2 y 3); los estambres en azul y en rosa el gineceo. B. Flor con el estilo en formación y anteras biesporangiadas con incipiente línea de dehiscencia. C. Acercamiento a la zona estigma-estilo. D. Flor en etapa de mayor diferenciación del estilo con respecto al ovario. E. Flor en *antesis*, con anteras dehiscentes y gineceo compuesto por estigma, estilo y ovario. Tanto el estilo como el ovario presentan osmóforos. F. Célula secretora de un osmóforo del estilo, las células son casi planas. G-H. Osmóforos del ovario, la célula secretora con mayor depresión que las del estilo y se encuentra rodeada por grandes células epidérmicas globosas. A- Antera; B-Bráctea; ET-Estigma; Ov-Ovario; SY-Estilo.

Histología e histoquímica floral

La flor en antesis en corte mediano muestra un receptáculo reducido, donde descansa el gineceo y los estambres. El ovario y el estilo se observan de igual longitud. El ovario presenta de 2-3 estratos parenquimáticos y en su interior se presenta un óvulo ortótropo, crasinucelado y unitégmico, de placentación basal. El saco embrionario es globoso y se observa desplazado hacia la zona micrópilar. El micrópilo está formado por el único tegumento biestratificado y se ubica justo en la base del prominente y ancho estilo, el cual es sólido, con tejido de transmisión y un haz vascular. Sobre la epidermis se observan depresiones, las cuales corresponden a células secretoras, en esta investigación las consideramos como osmóforos (son estructuras secretoras que producen el olor de las plantas mediante secreción de aceites volátiles) y se ubican en el estilo y el ovario. Los tricomas glandulares del raquis y de la bráctea entrarían en esta misma descripción. Estas células representan glándulas esquizogénicas unicelulares, cuya secreción se vierte hacia el exterior a través de la epidermis. El estilo presenta un incipiente tejido de transmisión (Fig. 8A). Estas células hundidas son ovaladas, de tamaño mayor que las del resto de la epidermis. El estigma tiene papilas unicelulares alargadas y sin secreción aparente. El androceo flaquea al gineceo y está formado por un par de anteras; cada una descansa sobre un filamento corto provisto de un haz vascular (Fig. 8A).

Al realizar las pruebas histoquímicas en el gineceo se encontró que las células secretoras de los osmóforos contienen aceites (Fig. 8B-C), polisacáridos insolubles (en las paredes celulares) y proteínas (Fig. 8D). El contenido de estas células son secretadas al momento de la liberación de los granos de polen durante la antesis. La secreción se produce por el rompimiento de la cutícula (Figs. 7C, F-H; 8B-D) y se deposita en las

depresiones epidérmicas (cavidades), ya que se han registrado pequeñas gotas de aceite sobre la epidermis y en algunas cavidades.

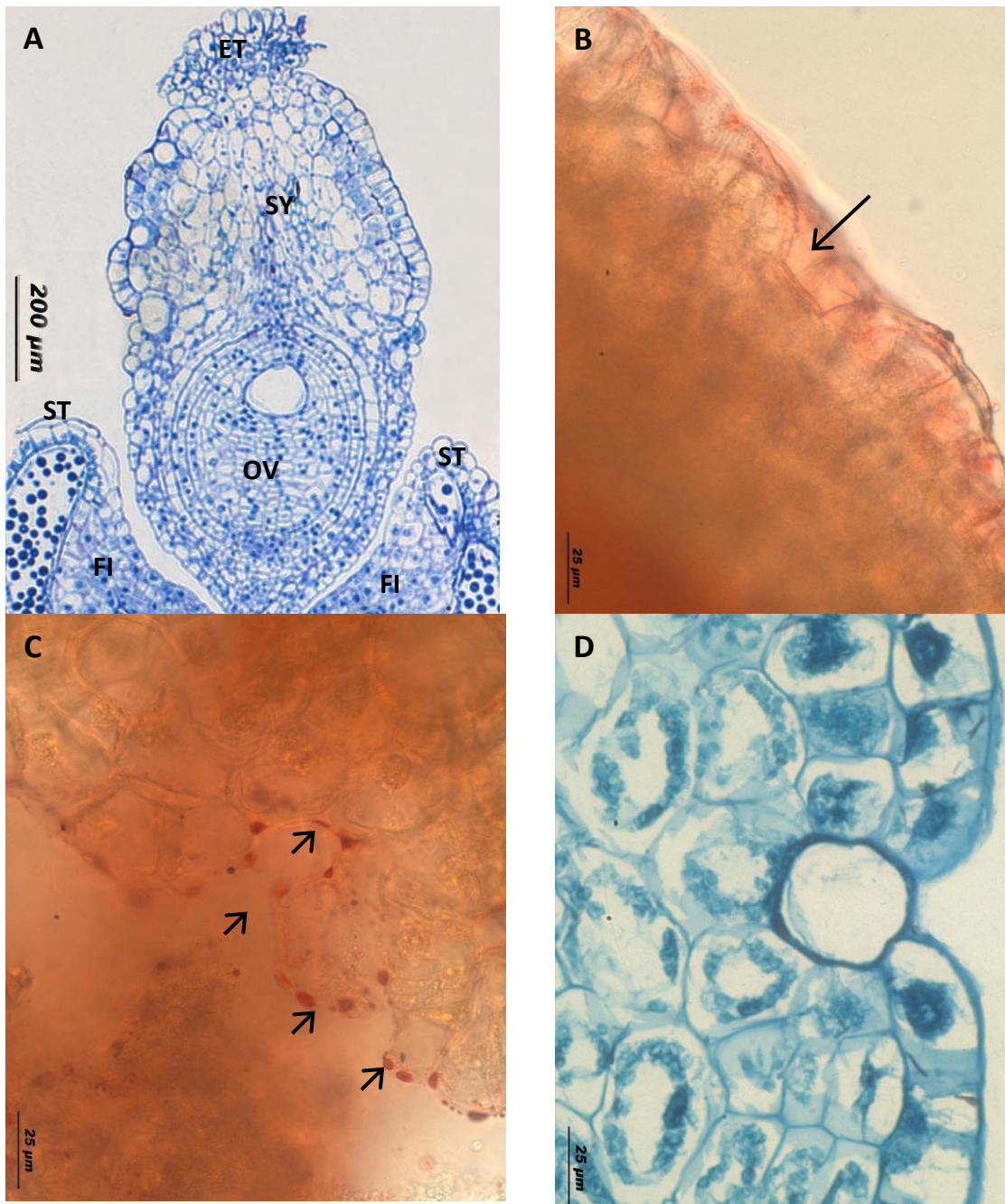


Figura 8. Histoquímicas realizadas en el gineceo. A. Corte longitudinal de una flor en antesis mostrando el gineceo y el androceo. Se visualizan células de aceite y tejido de transmisión en el estilo. **B-C.** Histoquímica con Rojo "O", mostrando lípidos en el citoplasma de la células secretoras y sobre la epidermis del ovario (flechas). **D.** Tinción con azul negro de Naftol-APS. Célula secretora donde se observa reacción positiva para proteínas en el citoplasma y los polisacáridos insolubles en las paredes celulares. **ET**-Estigma; **FI**- Filamentos; **OV**-Ovario; **ST**-Estambres; **SY**-Estilo

Desarrollo del gineceo y del óvulo

Posterior a la diferenciación de los primordios estaminales, aparece el primordio carpelar (Fig. 9A), el cual va creciendo axialmente y surge el primordio del óvulo desde una placenta basal. En el primordio del óvulo se observa a la protodermis nucelar, de la cual surge el tegumento biestratificado del óvulo. Subepidérmicamente una de las células nucleares se diferencia en la célula arquesporial, la cual pronto se divide periclinalmente (Fig. 9B). Posteriormente surge el estilo muy ensanchado. En la parte central del estilo comienza a formarse el tejido de transmisión y mientras que algunas células aisladas en posición subepidérmica se diferencia en células secretoras, que se caracterizan por ser de mayor tamaño y presentar numerosas vacuolas (Fig. 9C

Megasporogénesis y megagametogénesis

La célula arquesporial se divide y da origen a una célula parietal en posición subepidérmica y a la célula madre de la megaspora (CMMe). La CMMe inmediatamente se rodea de una pared de calosa y experimenta meiosis I, dando lugar a dos núcleos libres (sin división de citoplasma ni síntesis de paredes celulares entre ellos). Esta etapa corresponde a la díada de megasporas, lo cual ocurre antes de la división mitótica de la célula parietal. El tegumento es biestratificado y va rodeando a la nucela para formar el micrópilo (Fig. 9D).

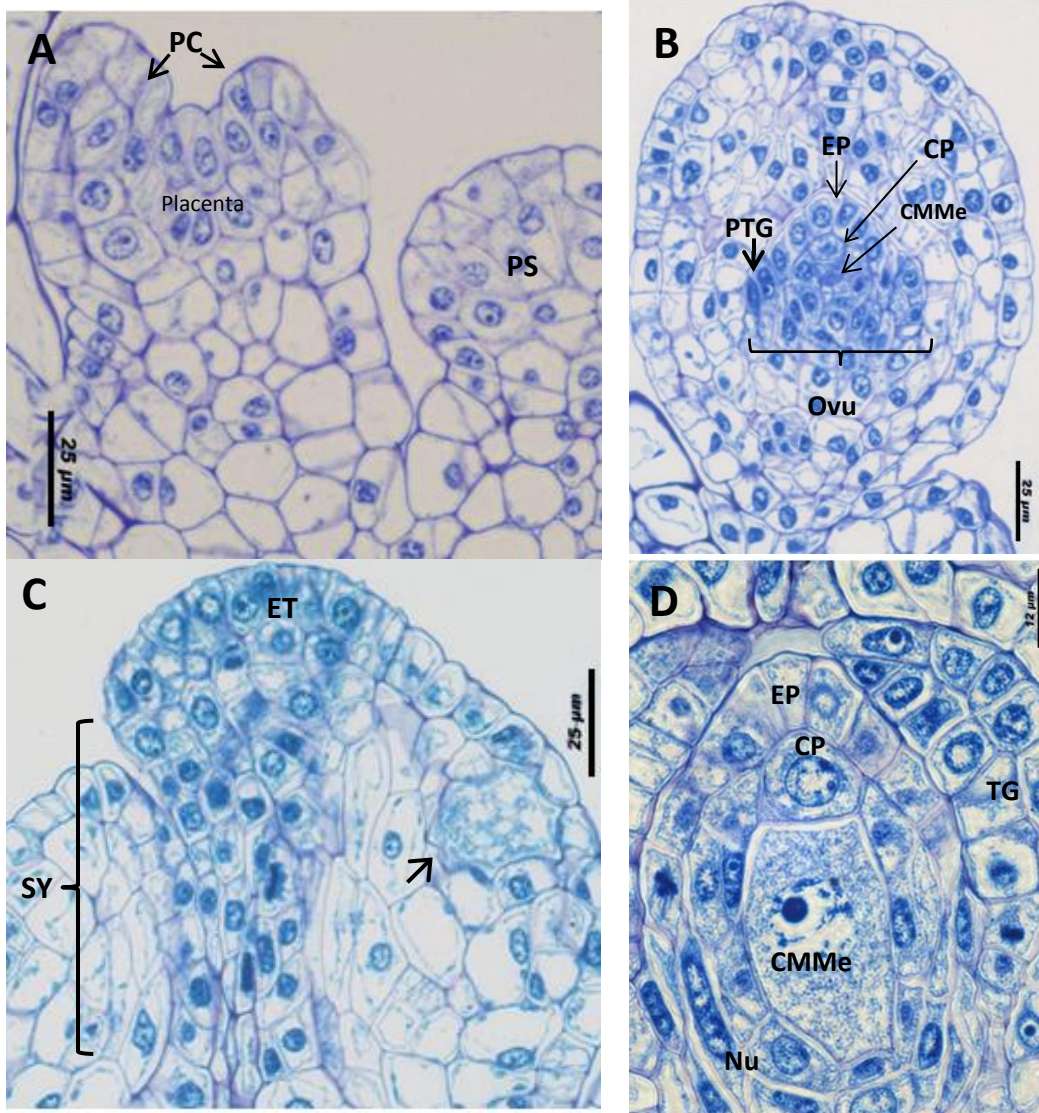


Figura 9. Cortes longitudinales de la iniciación floral. **A.** Botón floral mostrando el primordio del gineceo. **B.** Se observa el carpelo cerrado y el primordio del óvulo. La célula arqueosporial se ha dividido dando origen a la célula parietal y a la CMMe. **C.** Diferenciación del estilo y del estigma. Se observa en la zona del estilo una célula secretora en diferenciación (flecha). **D.** Primordio del óvulo. Se observa el tegumento biestratificado rodeando a la nucela. La CMMe presenta meiosis I, mientras que la célula parietal no se ha dividido mitóticamente. **CMMe**-Célula Madre de la Megaspora; **CP**- Célula Parietal; **EP**- Epidermis; **ET**-Estigma; **Nu**-Nucela; **Ovu**- Óvulo; **PC**-Primordio carpelar; **PS**- Primordio estaminal; **PTG**- Primordio de tegumento; **SY**- Estilo; **TG**-Tegumento.

Una vez separados los núcleos de la díada por la aparición de vacuolas en el citoplasma de la díada, la célula parietal se divide periclinalmente formando dos estratos subepidérmicos, inmediatamente las células de uno de esos estratos se vuelve a dividir, de tal forma que hay tres estratos de origen parietal que separan al saco embrionario de la epidermis nucelar (Fig. 10A).

Al presentarse la meiosis II se forman los cuatro núcleos de la tétrada de megasporas, la cual es coenocítica y ovoide, los núcleos en un arreglo 1+1+1+1, pero sin paredes entre ellos, siendo difícil ver los cuatro núcleos en un mismo plano debido al volumen del saco embrionario. El número de vacuolas aumenta considerablemente. En esta etapa los estratos parietales comienzan a degenerar cerca del micrópilo (Fig. 10B). Posteriormente los cuatro núcleos migran hacia la periferia por la fusión de vacuolas. En esta etapa el saco embrionario aumenta su superficie y toma una apariencia globosa. Los estratos nucleares alrededor del saco embrionario aumentan (Fig. 10C). Por medio de tinción con naranja de acridina y observación bajo fluorescencia logró observarse la tétrada de megasporas en cortes seriados (Fig. 10D-E).

Durante la megagametogénesis, los cuatro núcleos de la tétrada de megasporas experimentan una primera cariocinesis formando ocho núcleos libres (Fig. 10F), los cuales comienzan a migrar y a acomodarse, algunos en la periferia y otros en el centro del saco embrionario. Al mismo tiempo las células nucleares que rodean al saco embrionario comienzan a formar vacuolas (Fig. 11A). Una segunda división por cariocinesis en los ocho núcleos da lugar a 16 núcleos finales, los cuales migran a diversas zonas del saco embrionario. En esta etapa hay síntesis de paredes celulares alrededor de algunos de

ellos, ya sea individualmente o en conjuntos, así como la formación de varias vacuolas grandes y separadas por bandas citoplasmáticas (Fig. 11A).

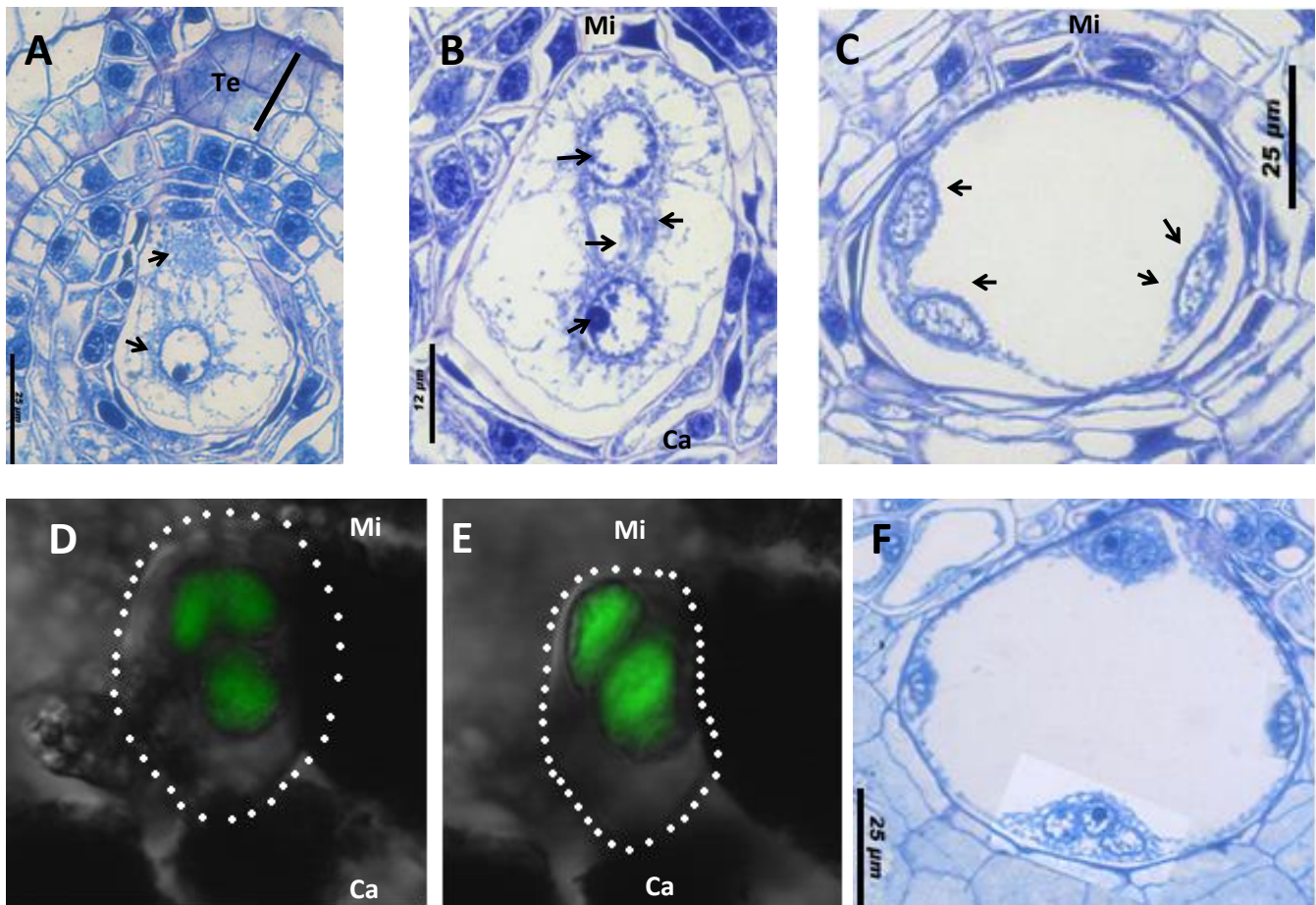


Figura 10. Megasporogénesis y megagametogénesis. **A.** Primera división meiótica, para formar una díada de megasporas (flechas), que se encuentra rodeada por tres estratos celulares de nucela producto de divisiones periclinales de la célula parietal. Aparecen vacuolas en el citoplasma de la díada. **B.** Segunda división meiótica, se señalan los cuatro núcleos (flechas). Se observa gran cantidad de vacuolas **C.** Tétrada de megasporas desplazadas hacia la periferia del saco embrionario, por la fusión de las vacuolas. **D-E.** Reconstrucción de un a tétrada de megasporas en cortes consecutivos. Se aprecian en verde los cuatro núcleos de la tétrada de megasporas, con la ayuda de naranja de acridina y la delimitación del saco embrionario (línea punteada). **F.** Reconstrucción de la primera división mitótica (megagametogénesis) para formar 8 núcleos. **Ca**-Cálaza; **Mi**-Micrópilo; **Te**-Tegumento.

Finalmente, el saco embrionario se organiza en 9 células. El arreglo final de las células del saco embrionario, es de acuerdo al original tipo *Peperomia*. Haciendo la reconstrucción con cortes seriados, este tipo de saco embrionario se caracteriza por

presentar una ovocélula y una sinérgida en la zona micropilar, seis células periféricas arregladas en grupos de dos y desplazadas ligeramente hacia la cálaza, y una célula central con ocho núcleos y grandes vacuolas que abarcan desde la zona micropilar hasta la calazal (Figs. 11B-C).

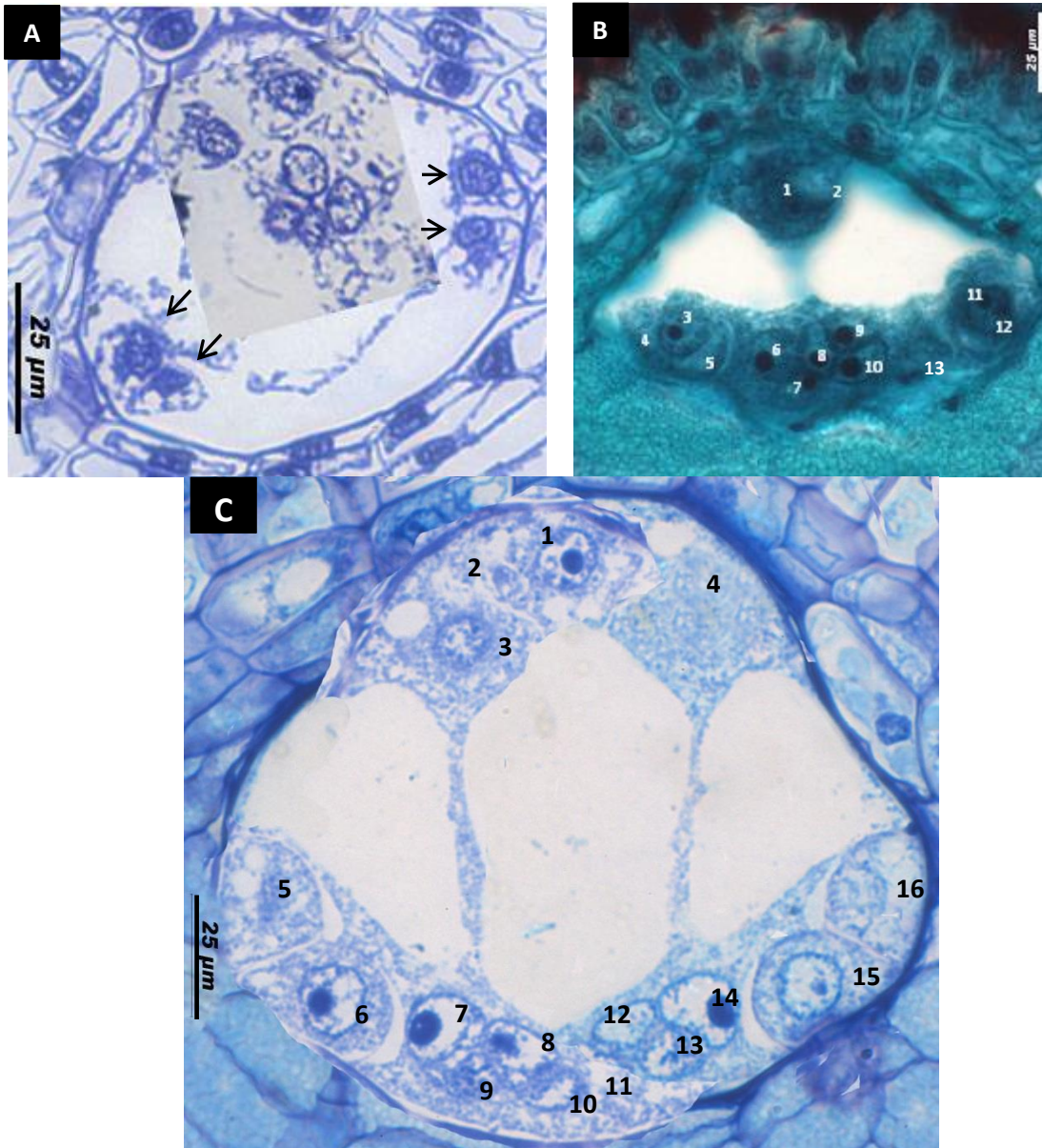


Figura 11. A. saco embrionario. A. Saco embrionario joven con mucho núcleos, la mayoría libres, pero otros con paredes celulares incipientes (flechas) y desplazados hacia la periferia del saco embrionario B. Corte longitudinal del saco embrionario maduro, mostrando 13 de los 16 núcleos que deben verse en total. C. Reconstrucción del aco embrionario maduro en el que se observan los 16 núcleos (numerados del 1 al 16).

Desarrollo del androceo

El androceo está compuesto por dos estambres ubicados lateralmente a cada lado del gineceo. Cada estambre tiene un corto filamento, sobre el cual se inserta basalmente una antera biesporangiada y monoteca. El desarrollo de las anteras inicia antes que el gineceo. Las divisiones celulares ocurren muy rápido, para formar la capa parietal de la antera y el tejido esporógeno a partir del tejido arquesporial (Fig. 12A). Posteriormente se forma una capa parietal primaria en posición subepidérmica (Figs. 12B), la cual se divide periclinalmente, formando una capa parietal secundaria externa (que se convierte en el endotecio) y una capa parietal secundaria interna. Ésta se dividirá periclinalmente para formar la capa media y el tapete, ambos uniestraficados, Este tipo de desarrollo de pared de antera corresponde al monocotiledóneo (Fig. 12C).

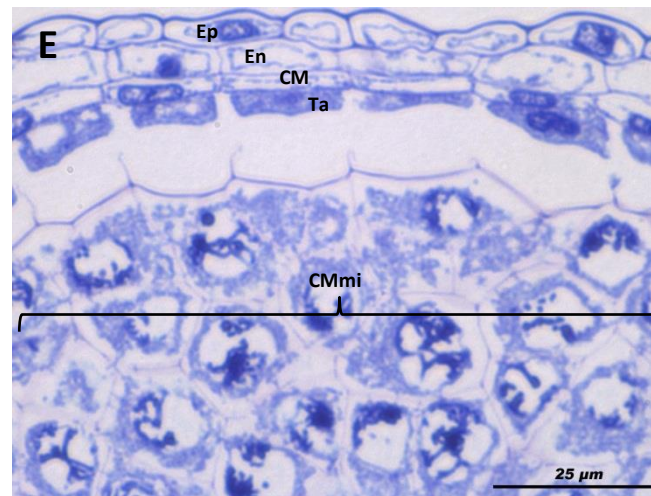
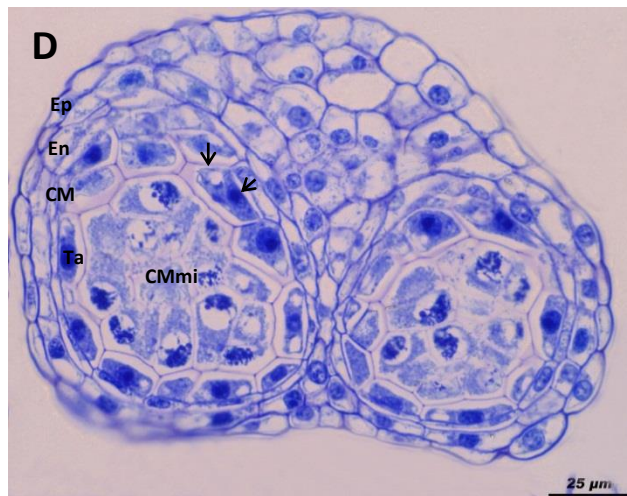
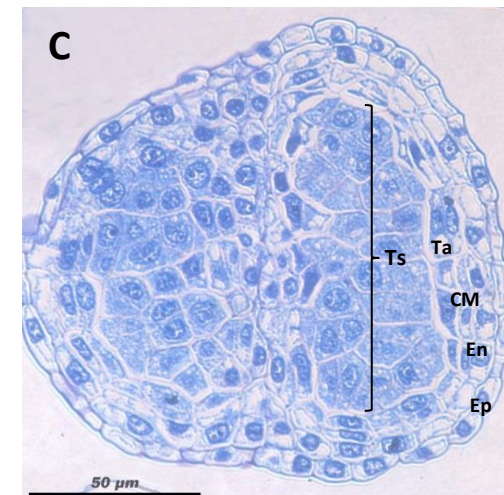
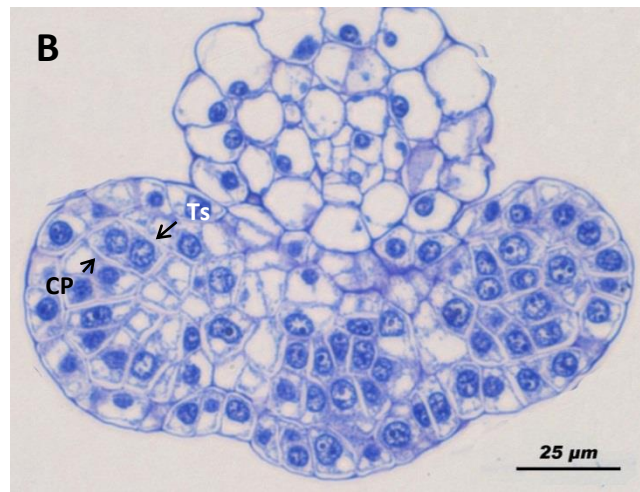
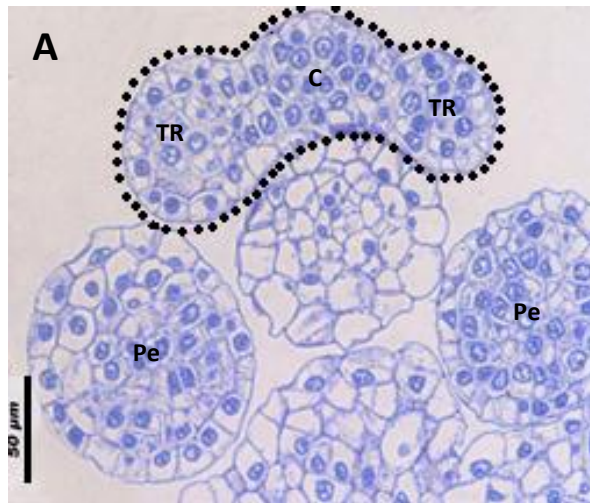


Figura 12. Desarrollo de las anteras. A. Delimitado por las líneas punteadas aparece un meristemo floral. En el centro de éste el meristemo carpelar y a los lados los primordios de anteras con diferenciación de tejido arquesporial. B. Corte transversal de botón floral mostrando los primordios de anteras con tejido esporógeno y capa parietal. C. Corte transversal de antera biesporangiada. La pared de la antera con epidermis, endotecio, capa media y tapete. En el centro de cada microsporangio se ha multiplicado el tejido esporógeno. D. Antera mostrando los dos microsporangios en etapa de células madre de las microsporas y tapete binucleado (flechas). E. Acercamiento a un microsporangio, mostrando la epidermis, endotecio, capa media, tapete secretor y células madre de las microsporas. C-Carpelo; CM-Capa media; CMmi-Célula madre de las microsporas; CP-Célula parietal; En-Endotecio; Ep-Epidermis; Pe-Primordio estaminal; TR-Tejido arquesporial; Ta-Tapete; Ts-Tejido esporógeno.

Microsporogénesis y microgametogénesis

Las células del tejido esporógeno se diferencian directamente en células madres de las microsporas, que se caracterizan por presentar una mayor actividad celular, puesto que los núcleos son de mayor tamaño y se rodean de calosa. Además de que están íntimamente relacionadas con el tapete, el cual tiene células rectangulares con núcleos conspicuos y con denso citoplasma (Fig. 12 D-E). En esta etapa la capa media comienza a degenerar.

Las células madres de las microsporas entran en meiosis, la cual es de tipo simultáneo, lo cual implica que la síntesis de paredes celulares ocurrirá hasta que finalice la meiosis II (Figs. 13A-B). Se forman tétradas de microsporas en diferente configuración. Se observaron tétradas en forma de T, tetraédricas, romboidales e isobilaterales (Fig. 13C). Cada microspora se encuentra rodeada de su propia pared celulósica y la tétrada por una pared de calosa (Fig. 13D).

Las microsporas se liberan de la tétrada y se convierten en granos de polen unicelulares, los cuales quedan libres en el lóculo del microsporangio y de una forma de media luna van tomando una apariencia redondeada y su pared se observa delgada (Fig. 13D).

Posteriormente la pared de la antera presenta algunos cambios estructurales, está formada por una epidermis de células alargadas y vacuoladas, un endotecio de células cúbicas multinucleadas, vacuoladas y con plastos. El tapete secretor y multinucleado se encuentra en degeneración (Fig. 13E).

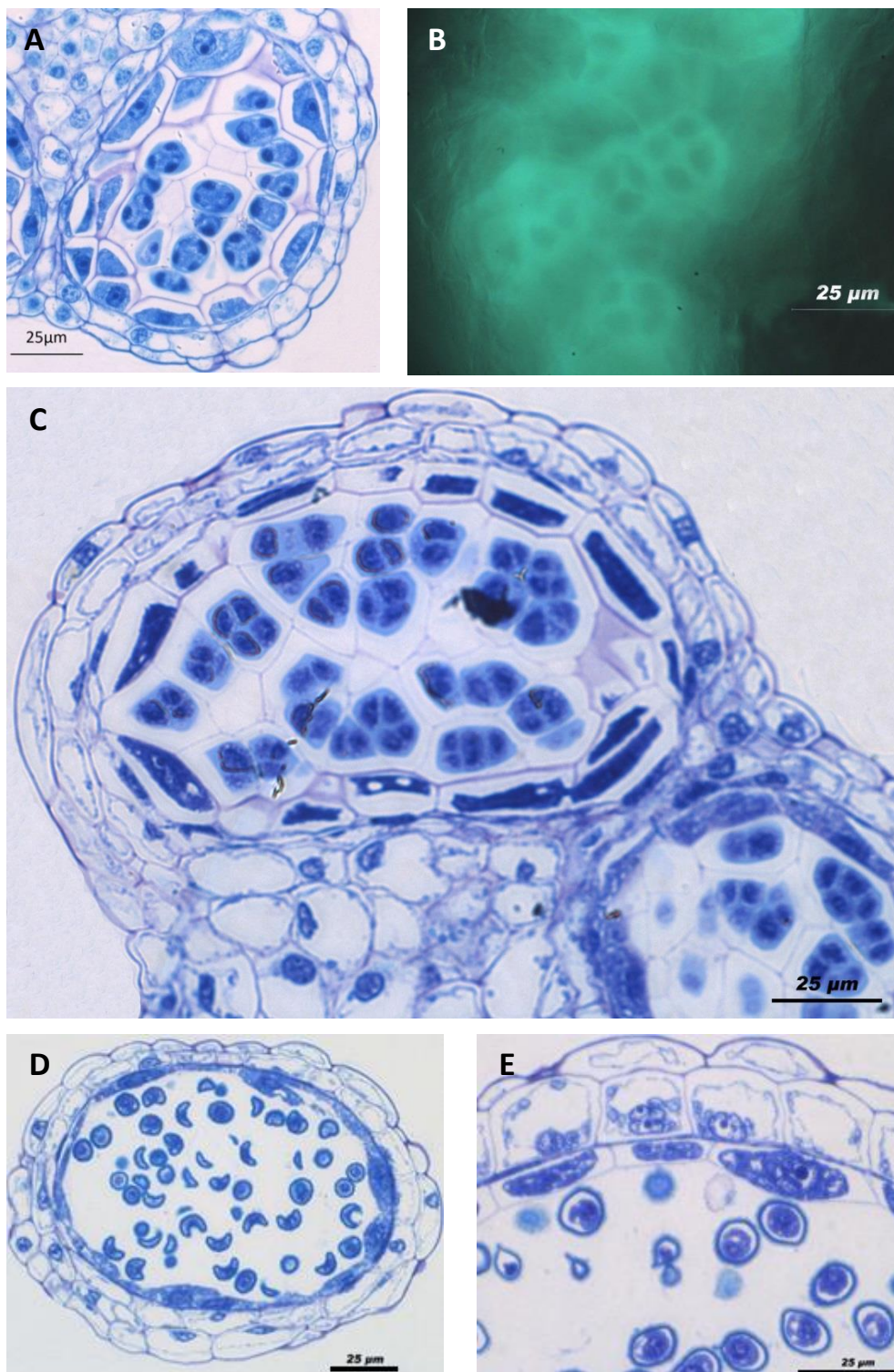


Figura 13. Microsporogénesis. **A.** Microsporangiocon tétradas recién formadas y rodeadas de calosa. La pared de la antera constituida por epidermis, endotecio, restos de la capa media y tapete. **B.** Tétradas de microsporas rodeadas por calosa, microscopía de flourescencia. **C.** Microsporangios con tétradas en forma de T, isobilaterales, romboidales y tetraédricas. El tapete con núcleos conspicuos y citoplasma denso. **D.** Microsporangio con microsporas recién liberadas de la calosa; tapete se encuentra en fase secretora, la capa media ha desaparecido y el endotecio con células grandes. **E.** Pared de la antera con tapete multinucleado y degenerando, el endotecio presenta núcleos divididos y plastos. Las microsporas en fase unicelular y con pared delgada.

Durante la microgametogenesis la célula del grano de polen presenta cariocinesis para formar dos núcleos en el interior de los granos de polen. La epidermis de la pared de la antera es delgada. El endotecio comienza a alargar sus células radialmente. Se observa una gran vacuola en cada una de las células del endotecio que desplaza al citoplasma (incluidos sus núcleos) hacia la pared celular más cercana al tapete.

Las paredes del endotecio se engrosan diferencialmente con contenidos lignificados en forma de barra. El contenido del citoplasmático del tapete va disminuyendo. Los granos de polen aumentan de tamaño, se observan reservas almidonosas en el interior del citoplasma de la célula vegetativa y la exina luce engrosada y ornamentada (Fig. 14A-B). Los granos de polen se dispersan siendo bicelulares (Figs. 14C).

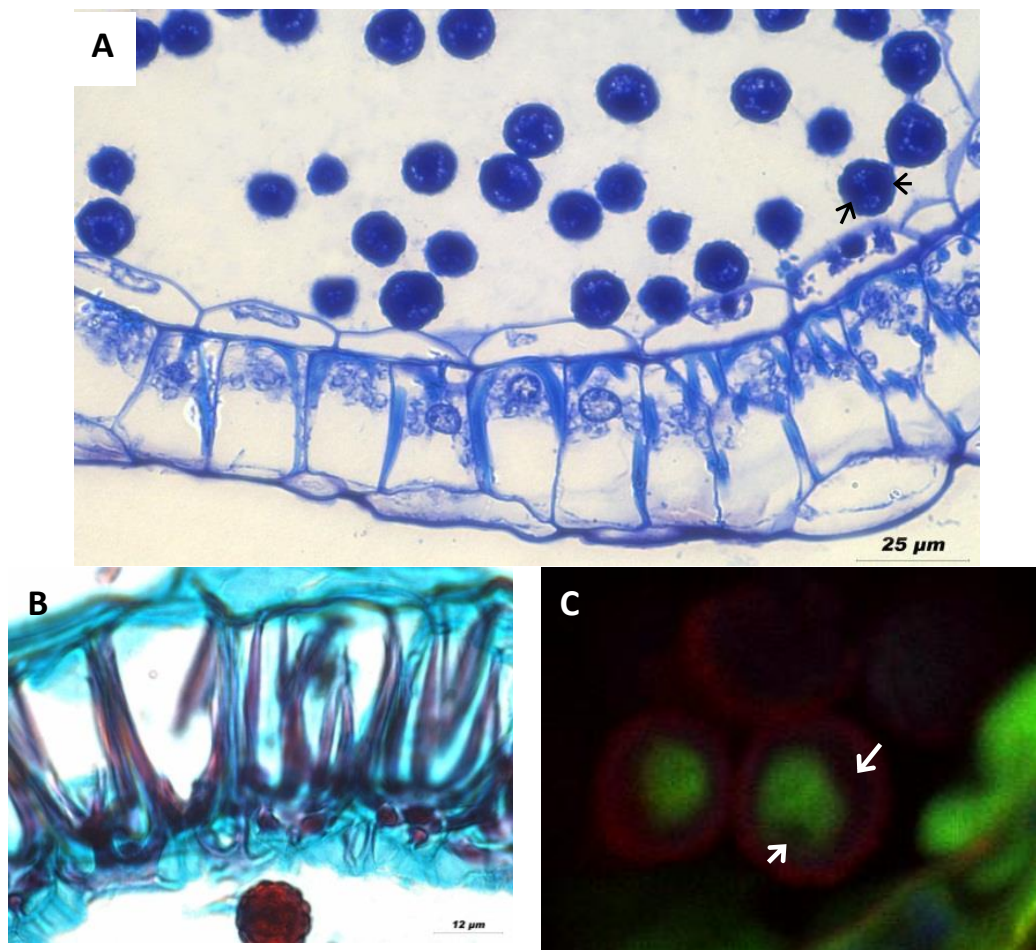


Figura 14. Desarrollo de granos de polen y pared de la antera. A. Granos de polen en etapa bicelular (las flechas señalan a los núcleos). Presencia de almidón como reserva. La pared de la antera con epidermis, endotecio multinucleado con engrosamiento en barras y tapete degenerando. B. Corte longitudinal en Paraplast. Acercamiento al endotecio. Se aprecian engrosamientos a lo largo de las células y una epidermis persistente. C. Micrografía en confocal. Acercamiento a granos de polen en etapa bicelular, las flechas señalan a los núcleos.

Micromorfología de las anteras y de los granos de polen

Las anteras maduras son basifijas, tienen apariencia redondeada y se unen al receptáculo por medio de un filamento corto. Las células epidérmicas de las anteras son relativamente grandes, cuyas paredes son rectas y casi lisas (Fig. 1A). La dehiscencia de las anteras es longitudinal extrorsa y se rompe dejando expuestos los granos de polen de cada microporangio (Fig. 15B). Cada antera libera aproximadamente 440 granos de polen.

Los granos de polen son pequeños (aproximadamente de 10-12 μm de diámetro), son isodiamétricos, inaberturados, con depresiones irregulares y presentan una ornamentación de la exina rugulada. Las rugulas son amplias y de diversos tamaños, sobre ellas se observa una ornamentación de la exina microequinada-rugulada (Fig.15C).

Para comprobar la viabilidad de los granos de polen se realizó la prueba de Alexander, encontrando que la mayor parte éstos son viables, puesto que el citoplasma se tiñó de color magenta.

Durante las observaciones de campo y durante las disecciones o polinizaciones manuales se colectaron algunos insectos caminadores (aún no identificados) que recorrían las inflorescencias, cuyos cuerpos estaban cubiertos de granos de polen y lo transportan de una flor a otra al moverse (Fig.15D-E).

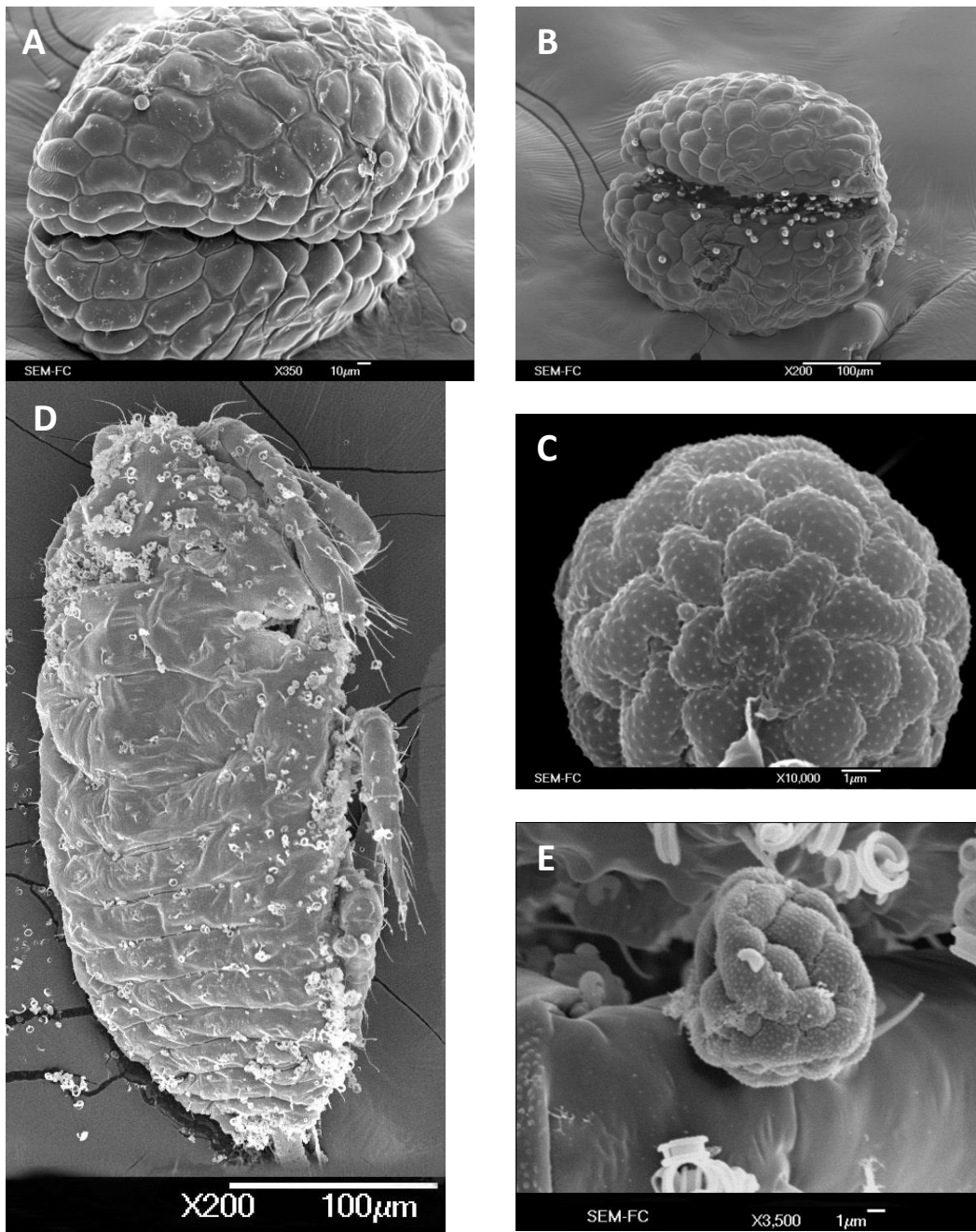


Figura 15. Morfología de las anteras, granos de polen y visitantes florales. A. Antera madura biesporangiada y monotecada. **B.** Antera dehiscente con apertura extrorsa. **C.** Grano de polen maduro e inaberturado. Se presentan verrugas de diversos tamaños. La ornamentación es microequinada-rugulada. **D.** Se observaron pequeños insectos caminadores que recorren la inflorescencia de flor en flor. Sobre su cuerpo se encontraron en algunos casos numerosos granos de polen. **E.** Grano de polen ubicado en la extremidad de un insecto aún no identificado.

Sistemas de cruza

En los cuatro tratamientos de polinización realizados se encontró lo siguiente:

- a) Polinizaciones cruzadas (xenogamia) manuales. De los granos de polen adheridos al estigma varios se observaron germinando (Fig. 16A-B). Después de las 48 h postpolinización al menos un tubo polínico llega al micrópilo (Fig. 16C).
- b) Autopolinizaciones (geitonogamia) manuales. Al realizar estas polinizaciones algunos de los granos de polen se adhieren al estigma e hidratan (Fig. 16D). Sólo en un pistilo polinizado se observó un tubo polínico creciendo en el tejido de transmisión, pero detuvo su crecimiento a la mitad del estilo, posiblemente como incompatible (Fig. 16E).
- c) Polinizaciones abiertas (sin manipular). En las plantas que se mantuvieron sin remover los insectos de las inflorescencias todos los ovarios se convirtieron en frutos con semillas. Indicando que los insectos pueden ser los vectores que mueven el polen de una flor a otra.
- d) Polinizaciones para apomixis. No se observaron frutos.

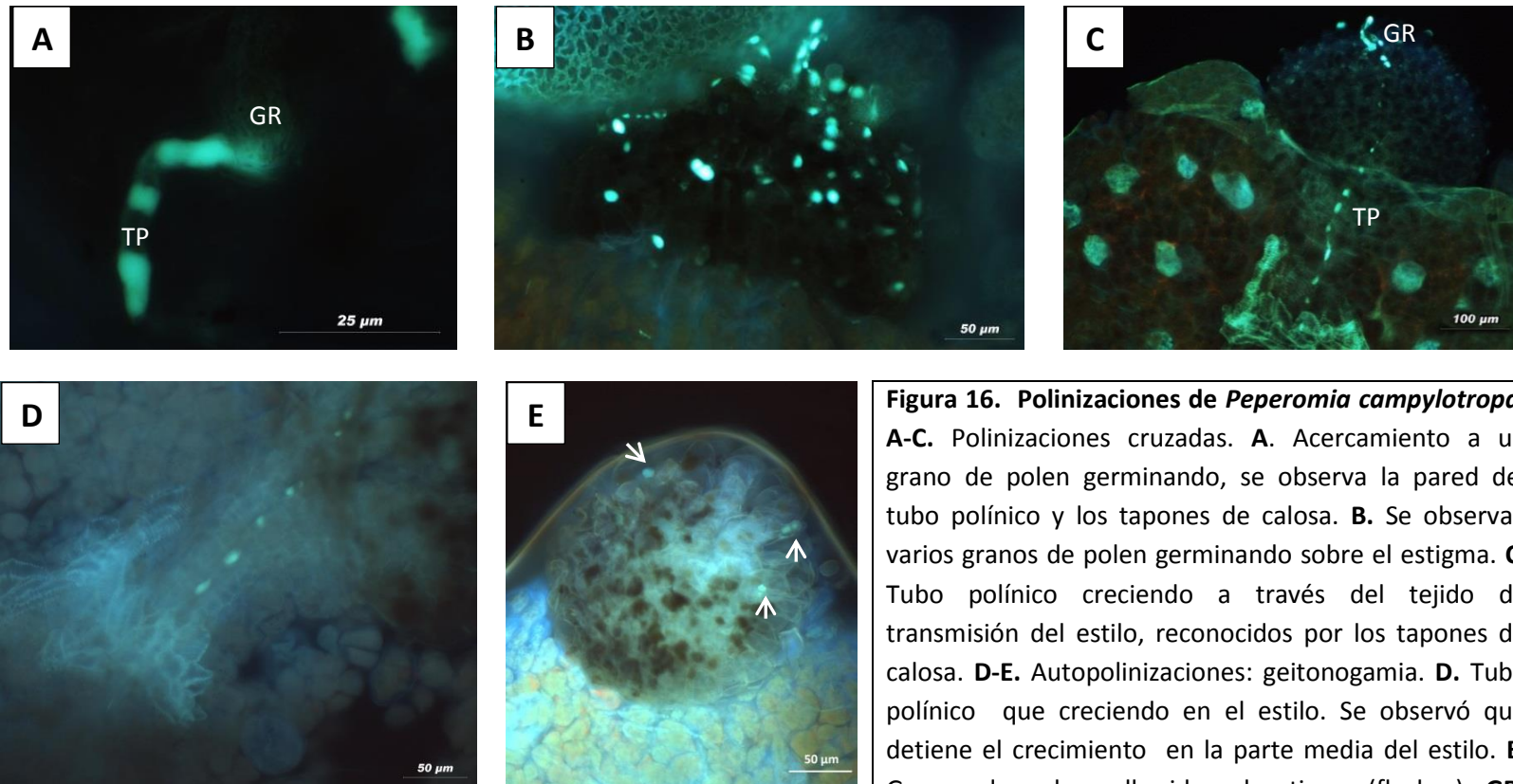


Figura 16. Polinizaciones de *Peperomia campylotropa*.
A-C. Polinizaciones cruzadas. **A.** Acercamiento a un grano de polen germinando, se observa la pared del tubo polínico y los tapones de calosa. **B.** Se observan varios granos de polen germinando sobre el estigma. **C.** Tubo polínico creciendo a través del tejido de transmisión del estilo, reconocidos por los tapones de calosa. **D-E.** Autopolinizaciones: geitonogamia. **D.** Tubo polínico que creciendo en el estilo. Se observó que detiene el crecimiento en la parte media del estilo. **E.** Granos de polen adheridos al estigma (flechas). **GR-**Grano de polen; **TP-**Tubo polínico.

DISCUSIÓN

A pesar de que el género *Peperomia* está representado por aproximadamente 1600 especies (Samian *et al.*, 2010), la existe información que aborde la biología reproductiva de ellas es escasa. Generalmente se desconoce cuáles son los sistemas de cruce predominantes en el grupo, cuáles son los polinizadores y qué ofrecen estas plantas como recompensa.

Particularmente en *P. campyloptropa*, sólo se ha descrito la anatomía del fruto (Martínez-Colín *et al.*, 2006) y se desconoce la embriología y anatomía de las estructuras reproductivas. Este es el primer estudio, en el que se aborda el conocimiento sobre la biología reproductiva de *Peperomia campyloptropa*.

Morfología de las inflorescencias y flores en desarrollo

En *Peperomia campyloptropa* se observó que las anteras son las primeras que se diferencian del meristemo floral y las flores son protándricas, ya que los granos de polen se liberan antes de que el estigma sea receptivo. Lo mismo ocurre en *P. metallica* y *P. rubella* (Tucker, 1980) así como en *Verhuellia lunaria*, otra especie de Piperaceae (Samain, 2010). En *Manekia naranjoa* las flores son reportadas como parcialmente protándricas, ya que tiene cuatro anteras, dos de ellas abren antes de que el estigma sea receptivo y el resto abren después (Arias y Williams, 2008). Lo anterior indica que al menos estas especies son protándricas, posiblemente para evitar la autofecundación. En algunas especies de *Piper*, la autofecundación se evita separando los sexos en sistemas dioicos como ocurre en *Pi. polysiphorum*, *Pi. bavinum*, *Pi. pedicellatum* y *Pi. pubicatulum* (Lei y Lian, 1998) y *P. guineense* (Smith *et al.*, 2008).

El estudio de la morfología y del desarrollo floral en *P. campyloptropa* permitieron conocer tanto los patrones de desarrollo como las características y estructuras involucradas en la forma de reproducción, la recompensa que se puede ofrecer a los visitantes florales y el tipo de sistemas de cruce presentes en esta especie. En la presente investigación se detectó que los tricomas glandulares presentes en las inflorescencias, en las brácteas y en el gineceo pueden funcionar como osmóforos para atraer a los visitantes cuando las flores están listas para ser polinizadas. Las glándulas de aceite presentes en el gineceo ya habían sido reportadas en el fruto de *P. campyloptropa* por (Martínez-Colín, 2006) y en el gineceo de *P. gracillicima*, *P. dolabriformis*, *P. tetraphylla*, *P. pellucida*, *P. fagerlindii*, *P. longespicata*, *P. magnollifolia* y *P. hylophila* (Samain et al., 2009), pero no se mencionó el contenido celular y mucho menos si son una forma de recompensa para polinizadores o sólo es un atrayente floral. Sin embargo se ha reconocido como una característica para el orden Piperales la presencia de células aceitosas (.Martínez, 2013).

En el trabajo realizado por Martínez-Colín (2006) en Piperaceae, se utilizaron esas células secretoras para delimitar la región del ovario porque sólo en él se encuentran y el estilo carece de ellas. Consideramos que estas glándulas pueden asumir en *Peperomia* una doble, actuando en la atracción de polinizadores y en la dispersión del fruto y las semillas. Glándulas similares se han observado en *Passiflora mooreana* (Passifloraceae), en la cual se consideran como osmóforos (Amela y Hoc, 1998). Nuestra aseveración se basa en las observaciones de pequeños insectos sobre las inflorescencias de *P. campyloptropa*, los cuales llevan consigo granos de polen, aunque se requiere de un estudio más minucioso, ya que también pueden ser considerados robadores de los aceites. Sin embargo, el reducido tamaño de sus flores dificulta las observaciones, al igual que se dificultan los experimentos sobre polinizaciones controladas para indagar sobre los sistemas de cruce.

Desarrollo del gineceo

En *P. campylotropa* los primordios carpelares tienen un crecimiento diferencial para una formación del estilo de un extremo carpelar, igual que lo reportado para *Peperomia metallica* (Tucker, 1980) y *Verhuellia lunaria* (Samain *et al.*, 2010). En *P. campylotropa* este crecimiento hace que se forme un estilo ensanchado y cónico. En las especies *Peperomia gracillicima*, *P. dolabriformis*, *P. tetraphylla*, *P. pellucida*, *P. fagerlindii*, *P. longespicata*, *P. magnollifolia* y *P. hylophila* se ha observado la presencia de estilo, pero en cada especie, éste es diferente al igual que la posición del estigma (Samain *et al.*, 2009)., lo cual nos sugiere que al ser un género tan grande las variaciones o características entre cada una de las especies serán mayores provocando que sea poco probable un consenso uniforme para las 1600 especies reportadas (Samain *et al.*, 2009).

El ovario en *Peperomia campylotropa* está formado por un carpelo, con un óvulo ortótropo y unitégmico como en el resto de las especies de *Peperomia* estudiadas; en *Manekia naranjoana* es tricarpelar y el óvulo es bitégmico (Arias y Williams, 2008). En *P. campylotropa* la meiosis de la célula madre de la megaspora forma una tétrada coenocítica en arreglo 1+1+1+1, mientras que en *Manekia naranjoana* el arreglo es 3+1, con un núcleo en la zona micropilar y tres en la calazal (Arias y Williams, 2008).

En el género *Peperomia* se presenta un saco embrionario tetraspórico del subtipo *Peperomia*, el cual fue descrito inicialmente para *Peperomia pellucida*, este tipo de saco presenta el mismo patrón durante los procesos de división celular, es decir, sin formación de paredes hasta que dichos procesos terminan. Los núcleos comienzan a agruparse y a sintetizar paredes celulares, como ocurre en *P. pellucida* (Campbell, 1901; Maheshwari, 1950; Johri *et al.*, 1992; Bhojwani y Bhatnagar, 1999), *P. dolabriformis* y *P. hispidula*

(Madrid y Friedman, 2010). Conforme se ha profundizado en el análisis de otras especies del género se ha concluido que existen variaciones con respecto a la configuración final del saco embrionario subtipo *Peperomia*. Es por ello que Madrid y Friedman (2010) sugieren que la mayor diversidad y la posible diversificación de sacos embrionarios en las angiospermas ocurrió en la familia Piperaceae y que el posible ancestro de este tipo de sacos embrionarios es el subtipo *Drusa*. La diversidad en la conformación de los núcleos de la célula central tiene una repercusión directa con la ploidía del endospermo, la cual es altamente variable en Piperaceae, en particular en el género *Peperomia*, lo cual permite reconstruir las modificaciones que pudieron haber ocurrido durante la diversificación del endospermo en las piperáceas.

El arreglo final que presenta cada especie, difiere en el número total de células que alberga cada saco embrionario. En *P. campyloptropa* se observó que el número final de células, es de 9, lo cual concuerda con la descripción del saco embrionario subtipo *Peperomia* original (Campbell, 1901; Maheshwari, 1937). De tal manera que *P. campyloptropa* hasta ahora es la única especie que coincide con la descripción original de este subtipo de saco embrionario. Sin embargo, en otras especies de *Peperomia* estudiadas como *P. pellucida*, en la cual se basó este tipo de saco embrionario, al ser reanalizada, resultó que presenta dos sinérgidas en lugar de una (Johnson, 1900; Campbell, 1901; Fisher, 1914; Maheshwari, 1950; Davis, 1966; Bhojwani y Bhatnagar, 2000), aumentando de esta forma el número total de células (de 9 a 10), modificando de esta manera la descripción original de saco embrionario subtipo *Peperomia* (Gvaladze y Akhalkatsi, 1998) y levantando el interés de reexaminar las especies inicialmente analizadas y que se mencionan en tabla 2. En el caso de *Manekia naranjoana*, el aparato ovocelular está formado por dos sinérgidas y una ovocélula, el número de núcleos que

forman la célula central varía al igual que los núcleos de las antípodas, por lo que su organización varía entre un saco embrionario tipo *Drusa* o tipo *Penaea* (Arias y Williams, 2008 y citas mencionadas ahí). En *Piper* el saco embrionario es tipo *Fritillaria* (Maheshwari, 1950).

Significado funcional de la tetrasporia en Piperaceae

Una de las funciones del endospermo es transportar los nutrientes contenidos en él hacia el embrión. En el caso de Piperales, los endospermos son variables en cuanto a la ploidía, ya que la célula central de los sacos embrionarios (los cuales tienen origen bispórico o tetraspóricos) tienen diversos núcleos. Dado que sólo una especie de *Piper* (desconocida pero citada por Maheshwari, 1946) presenta saco embrionario bispórico, éste se considera derivado, ya que en el resto de Piperaceae son de tipo tetraspórico. En otras familias de Piperales filogenéticamente basales con respecto a Piperaceae, Hydnoraceae presenta sacos embrionarios bispóricos, Saururaceae bispóricos (aunque está en duda) y monospóricos (en la mayoría de sus especies). En el caso de, Lactoridaceae y Aristolochiaceae son monospóricos, por lo que se interpreta que la tetrasporia debió derivarse del linaje que originó a Piperaceae (Arias y Williams, 2008). La tetrasporia se deriva de la monosporia o bisporia por la ausencia (o la incapacidad de formarse) paredes celulares durante la meiosis, de tal manera que los cuatro núcleos producto de la meiosis se conservan en el equivalente de la "megaspóra funcional" que da lugar al gametofito femenino. Trayendo como consecuencia un detenimiento temprano del desarrollo, ya que en lugar de que ocurran tres mitosis sólo se presentan dos para formar 16 núcleos (Arias y Williams, 2008). Todos otros gametofitos femeninos dentro de Piperaceae pueden considerarse filogenéticamente derivados (directa o indirectamente)

de un saco embrionario funcionalmente bisporico endospermo: las variantes de tipo Penaea en *M. naranjoana*, el tipo de Fritillaria dentro de Piper y el tipo de Peperomia (y sus variantes) dentro de *Peperomia* todos garantizan la inclusión de todo el genoma materno diploide en el endospermo (están representados los cuatro megasporos).

Desarrollo del androceo

En *P. campylotropa* se observó que los primero en diferenciarse del meristemo floral, son los primordios de los estambres como en *P. metallica* (Tucker, 1980) y *Verhuellia lunaria* (Samain *et al.*, 2010), lo que habla de un el patrón utilizado por la familia para la diferenciación de las estructuras reproductivas, puesto que en el género *Peperomia* el desarrollo de las anteras está truncado, es decir que siempre se formaran dos anteras (Jaramillo, *et al.*, 2004), lo cual nos podría sugerir que durante la evolución estas plantas optaron por la reducción de anteras, puesto que al solo presentarse una ovocélula se necesitan menos granos de polen y por ende el gasto energético es menor.

El desarrollo de la pared de la antera es del tipo monocotiledóneo, lo cual concuerda con lo descrito por Davis para Piperaceae (1966), quien afirma que este carácter es típico de de la familia. En cuanto al desarrollo de la microsporas se presenta una meiosis simultánea que coincide con lo reportado para Piperaceae (Davis, 1966; Lei *et al.*, 2002). Aunque para los grupos basales se ha mencionado que la meiosis es altamente variable e inclusive se pueden presentar formas intermedias (Furness *et al.*, 2002), lo cual, imposibilita una generalidad en el grupo y levanta el interés de profundizar sobre el desarrollo de las microsporas en la familia.

En cuanto al tipo de tétradas de microsporas de las especies anteriormente estudiadas por otros autores se había mencionado que son son tetraédricas, romboidales

e isobilaterales (Davis, 1966; Lei *et al.*, 2002), sin embargo algo nuevo que surgió al estudiar a *P. campyloptropa* fue que en un mismo microsporangio las tétradas también pueden ser en forma de “T” e incluso tetraédricas (aunque estas últimas en menor frecuencia). Lo anterior es interesante ya que no hay un consenso de lo que antes se consideraba como un patrón diferente para monocotiledóneas como dicotiledóneas como lo menciona Furness *et al.* (2002).

En el caso de *P. campyloptropa*, y *Verhuellia lunaria* (Samain *et al.*, 2010), los granos de polen son inaberturados, mientras que en *Piper*, *Zippelia* y *Makenia* los granos de polen son monosulcados (Samain, 2008; Samain *et al.*, 2010). Sin embargo, en muchas taxa la microsporogénesis simultánea se ha asociado a granos de polen monosulcados o inaberturados (Furness *et al.*, 2002). Siendo éstos más comunes en el grupo de las monocotiledóneas, lo cual es una evidencia más de las formas intermedias de micorporogénesis en los grupos basales.

En el momento que la capa media degenera los granos de polen son unicelulares. Una vez que el endotecio presenta bandas lignificadas a lo largo de sus células, los granos de polen ya son bicelulares y es de esta forma son liberados como lo reportado para la familia Piperaceae en general (Davis, 1966) y en específico en *Zippelia begoniaefolia* (Lei, *et al.*, 2002).

Otras por su parte han creado barreras espacio-temporales como la hercogamia y la dicogamia (protandria y protoginia).

La protandria, protoginia y la autoincompatibilidad son mecanismos muy eficientes para prevenir la autopolinización, los dos primeros mediante el desfase de maduración entre los órganos reproductores y el último sobre el efecto de inhibición ejercido en la

germinación del polen o la unión entre gametos producidos por el mismo individuo o grupos de individuos genéticamente similares (Imery-Buiza y Cequea-Ruiz, 2008; Singer, 2009). Estas estrategias reproductivas reducen los efectos perjudiciales de la endogamia y promueven las oportunidades para que se produzcan numerosas combinaciones genéticas que incrementan la diversidad (Brunet, 1996; Runions y Geber, 2000).

En cuanto a las primeras etapas de la fase progámica se observó que llegan varios granos de polen al estigma, los cuales germinan sobre éste, pero sólo un tubo polínico es el que crece a través del tejido de transmisión y posteriormente llegará al saco embrionario para llevar a cabo la fecundación.

La dicogamia puede también prevenir la autopolinización dentro de las flores, pero esto raramente evita la polinización en las flores hermafroditas (Barrett *et al.*, 1994). Esto ocasiona que en plantas como *P. campyloptropa*, en las que existe geitonogamia (polinización interfloral, debido a sus inflorescencias de tipo espiga) tenga que actuar el mecanismo de protandria e incompatibilidad para que se evite la autopolinización.

Sistemas de cruza

Las angiospermas con sistemas sexuales hermafroditas han desarrollado diferentes estrategias para evitar la autofecundación y con ello. En *P. campyloptropa* se presentaron fenómenos físicos y químicos que ayudan a evitar la autopolinización, y por lo tanto para disminuir la depresión por endogamia como es la maduración asincrónica de las estructuras sexuales (liberando a los granos de polen de una flor antes de que su estigma sea receptivo). Esto se ve fortalecido también con el rechazo de los granos de polen de la misma flor, lo cual fue detectado con la nula formación de semillas cuando las flores fueron polinizadas con su propio polen. Esto puede representar que *P. campyloptropa* es

una especie autoincompatible. Sin embargo se requiere aumentar el número de polinizaciones controladas. Debido a la dificultad que su tamaño floral, los reportes de los sistemas de cruce en Piperaceae son casi nulos. En el caso de *Manekia naranjoana* las autopolinizaciones no forman semillas, los granos de polen que llegan al estigma no logran germinar y se forman tapones de calosa (Arias y Williams, 2008). La fecundación descrita en *Manekia naranjoana* por Arias y Williams (2008) da cuenta de que el tubo polínico descarga en una sinérgida degenerada al tiempo de la fecundación, mientras que la otra persiste un poco más, los dos núcleos de la célula central (cuando el arreglo es del tipo Drusa) se fusionan previamente a la llegada del núcleo espermático y al finalizar la fusión el núcleo primario del endospermos resultante es triploide. Aunque en esa especie también hay sacos embrionarios tipo Penaea con célula central teranucleada (Arias y Williams, 2008). En *Zippelia* el saco embrionario es tipo Drusa (Lei *et al.*, 2002). En otras especies de *Peperomia* la célula central tiene más de cuatro núcleos, por lo que la ploidía del endospermo varía ampliamente.

CONCLUSIONES

Las flores de *P. campylostropa* son hermafroditas y protándricas, protegidas por una bráctea foliosa individual y arregladas espiraladamente sobre una inflorescencia cuyo raquis presenta tricomas glandulares.

El androceo está formado por dos estambres laterales con anteras bilobuladas y monotecas con tapete secretor. El tipo de desarrollo de la pared de la antera es tipo monocotiledóneo, la meiosis es simultánea y se forman tétradas isobilaterales, romboidales, lineales, tetraédricas y en "T". Los granos de polen son pequeños, bicelulares, radiosimétricos, presentan una ornamentación microequinada-rugurada, y son inaberturados.

El gineceo presenta ovario globoso, estilo ensanchado y estigma seco. Hay células secretoras de aceites principalmente (osmóforos), tanto en el estilo como en el ovario como como posible recompensa a sus visitantes florales. El óvulo es ortótropo, crasinucelado, unitégmico y sésil. El saco embrionario tetraspórico tienen 16 núcleos, repartidos en 9 células, el aparato ovocelular formado una sinérgida y una ovocélula.

Los sistemas de cruce indican autoincompatibilidad y dicogamia (protandria), se requiere de polinizadores (insectos) para transportar el polen.

LITERATURA CONSULTADA

- Aguilar O.E. 2007. Estudio fitoquímico exploratorio de *Peperomia cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz (Piperaceae), especies endémicas de Guatemala. Tesis de licenciatura (Química). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Pp.67
- Amela G.M. y Hoc. S.P. 1998. Floral biology and reproductive system of *Passiflora mooreana* (Passifloraceae). *Darwiniana*. 35: 9-27.
- Arias T. y Williams J. 2008. Embryology of *Manekia naranjoana* (Piperaceae) and the origin of tetrasporic, 16-nucleate female gametophytes in Piperales. *American Journal Botany* 95(3): 272-285.
- Barrett S.C.H, Harder L.D. y Cole W.W. 1994. Effects of flower number and position on self-fertilization in experimental population in experimental populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Functional Ecology* 8: 526-535.
- Brunet J. 1996. Male reproductive success and variation in fruit and seed set in *Aquilegia caerulea* (Ranunculaceae). *Ecology*. 77: 2458-2471.
- Bhojwani S.S y Bhatnagar S.P. 1999. The embryology of angiosperms. *Vikas publishing house PVT LTD*. India
- Calderón R.G. 1969. El género *Peperomia* (Piperaceae) en el Valle de México. *Ciencia*. México
- Campbell D. H. 1901. The embryo-sac of *Peperomia*. *Annals of Botany* 15: 103-117.
- Castillo C.S., Martínez O.Y., Romero R. M., Guadarrama C. P., Núñez C. O., Sánchez G. I. y Meave J. 2007. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: aspectos florísticos y ecológicos. Departamento de Ecología y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Davis 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. *J. Wiley*. Nueva York 528pp.
- de Figueiredo A.R. y Sazima M.1999. Pollination Biology of Piperaceae species in Southeastern Brazil. *Annals of botany*. 85:455-460

- de Souza A. L., Sebastiao M.I., Mathias M.K.S., Meyer A. A. L., Carvalho I. M., Henrique G.O.J., Maciel. R.S. 2009. Vegetative Propagation in Piperaceae Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2(6) :1357-1361.
- Fisher C.G. 1914. Seed development in the genus *Peperomia*. *Torrey Botanical Society*. 41(3): 137-156.
- Frodin G.D. 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53(3) 753-776.
- Furness A.C., Rudall J.P. y Sampson B. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International journal of plant sciences*. 163 (2): 235-260.
- Guillermo F. 2002. Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R. et P., Aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. Tesis de licenciatura (Químico farmacéutico) Facultad de Farmacia y bioquímica. E.A.P. de Farmacia y bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Guillermo F., Bonilla P., Arroyo J. 2005. Healing effect of *Peperomia scutellaefolia* R. et P. in a murine model. *Folia Dermatol.* Perú 16(1): 15-22
- Gvaladze G. y Akhalkatsi M. 1998. Double fertilization in *Peperomia pellucida*. *Phytomorphology* 48(4) 405-409.
- Hickey M. y King C. 1981. 100 families of flowering plants. *Cambridge University press*. Gran Bretaña.
- Imery-Buiza J y Cequea-Ruiz H. 2008. Autoincompatibilidad y protandria en poblaciones naturalizadas de *Aloe vera* de la península de Araya, Venezuela. *Polibotánica*. 26:113-125.
- Jaramillo A., Manos S.P. y Zimmer A.E. 2004. Phylogenetic relationships of the perianthless piperales: reconstructing the evolution of floral development. *International Journal of Plant Sciences* 165(3):403-416.
- Johri B.M., 1984. Embryology of angiosperms. *Springer*. Berlin. 830pp.
- Johri B.M., Ambegaokar K.B. y Srivastava P.S. 1992. Comparative embryology of Angiosperms. Springer. Berlin.
- Johnson D.S., 1900. On the endosperm and embryo of *Peperomia pellucida*. *Botanical Gazette*. 30: 1-10.

- Johnson D.S., 1914. Studies of the development of the Piperaceae. II. The structure and seed-development of *Peperomia hispidula*. *American Journal of Botany* 7:323-339.
- Judd S.W., Campbell S.C., Kellogg A.E., Stevens F.P. y Donoghue J.M. 2002. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. U.S.A.
- Lei L-G. y Liang H-X. 1998. Floral development of dioecious species and trends of floral evolution in *Piper sensu lato*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 127 (3): 225-237.
- Lei L-G., Wu Z-Y. y Liang H-X. 2002. Embryology of *Zippelia begoniaefolia* (Piperaceae) and its systematic relationships. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140:49-64.
- López C. L., Márquez J. y Munguía G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. *Las prensas de Ciencias*. Facultad de Ciencias. UNAM. 178 pp.
- Madrid N.E. y Friedman E.W. 2009. The developmental basis of an evolutionary diversification of female gametophyte structure in *Piper* and Piperaceae. *Annals of Botany* 103: 869-884.
- Madrid N.E. y Friedman E.W. 2010. Female gametophyte and early development in *Peperomia* (Piperaceae). *American Journal of Botany*. 97(1): 1-14
- Maheshwari P. 1937. A critical review of the types of embryo sacs in angiosperms. *New Phytologist*. 36: 359-417.
- Maheshwari P., 1950. To the embryology of angiosperms. *McGraw-Hill*. Estados Unidos de América
- Martínez-Colín M.A., Engleman M.E. y Koch D.S. 2006. Contribución al conocimiento de *Peperomia* (Piperaceae): fruto y semilla. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 78: 83-94
- Martínez G.M. 2013. Clasificación de angiospermas. En: Márquez G.J., Collazo O.M., Martínez G.M., Orozco S.A. y Vázquez S.S. (Eds). Biología de angiospermas. *Las prensas de Ciencias*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D:F: p. 436-449.

- Martinoli G. 1948. Embriología de *Peperomia maculosa* Hook. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* 55: 235 – 250.
- Mathieu G., Symmank L., Callejas R., Wanke S., Neinhuis C., Goetghebeur P. y Samain MS. 2011. New geophytic *Peperomia* (Piperaceae) species from Mexico, Belize and Costa Rica. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 357-382.
- Molina-Paniagua M. y Zamudio R. S. 2010. Estudio Florístico del pedregal de Arócutin, en la Cuenca del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo complementario XXV. Disponible en <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/ComplementarioXXV.pdf>
- Murty Y.S. 1958. Studies in the orden Piperales, II. A contribucion to the study of vascular anatomy of the flower of *Peperomia*. *Journal Indian Botany Society*. 37: 474-491.
- Murty Y.S. 1960. Studies in the Piperales. VIII. A contribution to the morphology of *Houttuynia cordata* Trunb. *Phytomorphology* 10:329-341
- Nikiticheva Z. L. 1981. Embryological features of some Piperales. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 50: 329-332.
- Nikiticheva Z. L., Yakovlev S.M. y Plyushch A.T. 1981. The development of the ovule, embryo sac and endosperm in *Peperomia* sp. (Piperaceae). *Botanicheskii Zhurnal* 66:1388-1398.
- Reiser L. y Fischer L.R. 1993. The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell* 5:1291-1301.
- Remizowa M., Rudall J. P. y Sokoloff D. 2005. Evolutionary transitions among flowers of perianthless piperales: inferences from inflorescence and flower development in the anomalous species *Peperomia fraseri* (Piperaceae). *International Journal of Plant Sciences* 166:925-943.
- Rzedowzki J. 1978. Vegetación de México. *CONABIO. Ed. Limusa*. México.
- Runions J.C. y Geber M.A. 2000. Evolution of the self-pollinating flower in *Clarkia xantiana* (Onagraceae). I. Size and development of floral organs. *American Journal Botany*. 87:1439-1451.
- Sarukhán J. 1997. Acuerdo por el que se reestructura e incrementa la zona de la Reserva Ecológica y se declaran las áreas verdes de manejo especial de la

Ciudad Universitaria. *Gaceta*. N° 3070. Universidad Nacional Autónoma de México

- Samian M.S. 2008. Tackling Pandora's Box. Order out of chaos in the giant genus *Peperomia* (Piperaceae). Tesis Doctoral. Ghent University. Bélgica
- Samian M.S., Vanderschaeve L., Chaerle P., Goetghebeur P., Neinhuis C. y Wanke S. 2009. Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus *Peperomia* (Piperaceae)?. *Plant Systematics and Evolution*. 278:1-21.
- Samian M.S., Vrijdaghs A., Hesse M., Goetghebeur P., Jiménez R.F., Stoll A., Neinhuis C. y Wanke S. 2010. *Verhuellia* is segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. *Annals of Botany*. 105:677-688.
- Semple S.K. 1974. Pollination in Piperaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 61(3): 868-871.
- Short P.S. y Cowie D.I. 2011. Flora of the Darwin Region. *Northern Territory Government*. Vol.1
- Singer B.R. 2009. Floral Morphology and Pollination in Orchidaceae: Charles Darwin's Second Book. *Acta biológica Colombiana*. 337-350.
- Smith J.F., Stevens A.C., Tepe E.J., y Davidson C. 2008. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). *Plant Systematic and Evolution* 275:9–30.
- Tebb M.C. 1989. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Botany)* 19: 117-158.
- Trelease W. 1922. The Peltate peperomias of North America. *Botanical Gazette*. 73: 117-158.
- Tucker S. 1980. Inflorescence and flower development in the Piperaceae. I. *Peperomia*. *American Journal of Botany* 67(5): 686-702.
- Tucker S., Douglas W.A. y Liang H-X. 1993. Utility of Ontogenetic and Conventional Characters in Determining Phylogenetic Relationships of Saururaceae and Piperaceae (Piperales). *Systematic Botany*. 18(4):614-641.

- Vázquez S.S. 2013. Desarrollo del gineceo. En: Márquez G.J., Collazo O.M., Martínez G.M., Orozco S.A. y Vázquez S.S. (Eds). *Biología de angiospermas. Las prensas de Ciencias*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D:F: p 90-100.
- Wanke S, Jaramillo MA, Borsch T, Samain MS, Quandt D, Neinhuis C. 2007a. Evolution of the Piperales – matK and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 477–497

Anexo 1. Grupos principales de desarrollo de saco embrionario

Sacos embrionarios monospóricos. Se forman a partir una sola de las cuatro megasporas de la tétrada (megaspóra funcional). Se pueden distinguir dos subtipos: el Polygonum (el típico de las angiospermas), Oenothera. Todos los núcleos del saco embrionario maduro son haploides porque se originan por meiosis de un solo núcleo (Maheshwari, 1937; 1950; Davis, 1966; Reiser y Ficher, 1993; Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013).

- Tipo Polygonum. Este saco embrionario se origina de la megaspóra calazal de la tétrada, la cual, después de tres mitosis consecutivas, da lugar a un saco embrionario de siete células y ocho núcleos, repartidos de la siguiente manera: dos sinérgidas, una ovocélula, tres antípodas en la zona calazal y una célula central con dos núcleos polares entre la zona calazal y la zona micropilar (Maheshwari, 1937; Reiser y Ficher, 1993; Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013; Anexo 1a).
- Tipo Oenothera. Este saco embrionario se origina a partir de la megaspóra micropilar de la tétrada y da origen a un saco maduro de cuatro células y cuatro núcleos, repartidos de la siguiente manera: dos sinérgidas y una ovocélula en la zona micropilar, y una célula central con un núcleo (Maheshwari, 1937; Reiser y Ficher, 1993; Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013; Anexo 1b).

Sacos embrionarios bispóricos. En este grupo ocurre la meiosis I, formando pared celular entre las dos células que constituyen la díada. La meiosis II sólo va a ocurrir en una de ellas, mientras que la otra degenera. La díada funcional entra en meiosis II sin formación de pared celular y ambos núcleos se dividen dos veces por cariocinesis. Los ocho núcleos finales se organizan como en el tipo Polygonum. (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013).

- Tipo Allium. El saco embrionario se deriva de la díada en posición calazal, creando un saco embrionario maduro como en el tipo Polygonum (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013; Anexo 1c).
- Tipo Endimion. El saco embrionario se forma de la díada micropilar y origina un saco embrionario maduro que se organiza como el de tipo Polygonum (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013; Anexo 1d).

Sacos embrionarios tetraspóricos. En este grupo no hay formación de paredes celulares después de las divisiones meióticas, de tal manera que la tétrada de megasporas resultante es cenocítica y los cuatro núcleos de la misma participan en la formación del saco embrionario. Este grupo es el más heterogéneo, ya que el arreglo de los núcleos después de la meiosis es de tres

tipos y ocurren fusiones preliminares antes de las cariocinesis. El primer arreglo se llama 2+2, o sea, dos núcleos previos a la cariocinesis se ubican en la zona micropilar y dos en la calaza. El segundo arreglo nuclear es de 1+1+1+1: uno se ubica en la región micropilar, otro hacia la región calaza y dos ubicados lateralmente uno al otro. El tercer arreglo es 1+3: un núcleo en la región micropilar y tres hacia la región calaza. La complejidad aumenta dependiendo de si hay fusión nuclear o no, previa a las cariocinesis. También pueden ocurrir diferentes divisiones cariocinéticas. Subgrupo I. Lo conforman aquellos tipos de sacos embrionarios donde no hay fusión nuclear previa a la cariocinesis (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013).

- Tipo Adoxa. El saco embrionario maduro se forma después de una sola división mitótica postmeiótica. La organización es similar al saco embrionario tipo Polygonum (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Anexo 1e).
- Tipo Penaea. Existen dos divisiones mitóticas postmeióticas, resultando en un saco embrionario con 16 núcleos. La célula central es tetranucleada; en el micrópilo hay dos sinérgidas y una ovocélula, en la calaza hay tres antípodas, y tres núcleos en cada lado (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Anexo 1f).
- Tipo Plumbago. Se presenta una sola división mitótica y, a pesar de ser octanucleado, el aparato ovocelular está formado únicamente por la ovocélula; la célula central es tetranucleada, hay una antípoda en el extremo calaza y las dos células restantes (periféricas) se ubican lateralmente una de la otra (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Anexo 1g)
- Tipo Peperomia. Semejante al tipo Penaea, tiene 16 núcleos organizados en nueve células. En la zona micropilar está la ovocélula y una sinérgida, seis células periféricas y una célula central con ocho núcleos polares (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Anexo 1h)
- Tipo Drusa. Tiene 16 núcleos organizados en 15 células. El aparato ovocelular formado por una ovocélula y dos sinérgidas, la célula central con dos núcleos polares y las 11 células restantes se ubican en el extremo calaza como antípodas (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Anexo 1i)

Subgrupo II. Lo conforman aquellos tipos de sacos embrionarios que previamente presentan una fusión de tres de los cuatro núcleos meióticos antes de la cariocinesis (en aquellos que presentan arreglo 1+3), que se ubican al extremo calaza. Las divisiones nucleares posteriores producen núcleos de dos tipos: triploides y haploides (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Vázquez, 2013).

- Tipo Fritillaria. El núcleo triploide calaza y el haploide micropilar se dividen dos veces, dando lugar a cuatro núcleos en cada polo. El saco embrionario maduro es heptacelular y octanucleado. El aparato ovocelular está formado por dos sinérgidas y una ovocélula, las tres, haploides. En el extremo calaza hay tres antípodas triploides. La célula central es

binucleada, pero uno de sus núcleos es triploide y el otro es haploide (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Anexo 1j).

- Tipo Plumbagella. Después de la triple fusión de los núcleos calazales sólo se presenta una división cariocinética, formándose dos núcleos calazales triploides y dos núcleos micropilares haploides, que forman un saco embrionario tricelular: en el micrópilo una ovocélula, en la cálaza una antípoda triploide y la célula central binucleada, con un núcleo triploide y otro haploide (Bhojwani y Bhatnagar, 2000; Anexo 1k).