



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estructura y ultraestructura del óvulo de *Noveloa  
coulteriana* (Podostemaceae)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MERCEDES GUADALUPE OTERO RAMÍREZ**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN**

**MÉXICO, D. F.**

**Abril 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Otero

Ramírez

Mercedes Guadalupe

58 32 35 72

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306180015

### 2. Doctora en Ciencias

Guadalupe Judith

Márquez

Guzmán

### 3. Doctora en Ciencias

Sonia

Vázquez

Santana

### 4. Doctora en Ciencias

Karina

Jiménez

Durán

### 5. Doctora en Ciencias

Martha Juana

Martínez

Gordillo

### 6. Maestra en Ciencias

Mónica Karina

Pérez

Pacheco

### 7. Datos del trabajo escrito.

Estructura y ultraestructura del óvulo de *Noveloa coulteriana* (Podostemaceae)

Número de páginas 54

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo en Plantas, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **DEDICO ESTA TESIS A:**

A Saúl Martínez el amor de mi vida, por su apoyo incondicional para la culminación de éste trabajo, por creer en mi cuando ni yo misma lo hacía, por soportar mis estados de ánimo conforme este escrito iba avanzando, por apoyarme en todo aun cuando sacrificabas tu propios intereses, por tus consejos, por escucharme en los momentos que más lo necesitaba y darme ánimos para nunca darme por vencida, por siempre estar a mi lado cuando lo necesitaba, por quererme a pesar de todo, por ser la persona que todos quisieran tener a su lado.

Este logro no es solo mío, es de ambos, tú has sido una parte importante de este proceso y ahora podemos decir ¡Lo logramos!

El próximo eres tú, te prometo que te brindaré todo el apoyo necesario para que muy pronto logres las metas que te has trazado. Gracias por todo tu cariño. ¡Te amo!

Mi mamá Silvia, por todo su cariño y paciencia.

Mi papá Enrique Otero, por todas sus enseñanzas que me han ayudado a ser la mujer que ahora soy.

Mis hermanitos: Laura, Vero y Enrique por su apoyo incondicional.

Mi tía Tere, por todo tu cariño y por sus sabios consejos.

Mis abuelitos, por su apoyo en los momentos difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por su gran apoyo desde el inicio de este proceso, por su comprensión y sus consejos, por ayudarme a culminar este trabajo a tiempo.

A los miembros de mi jurado Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Karina Jiménez Durán, Dra. Martha Juana Martínez Gordillo y M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco por sus valiosas observaciones para mejorar este trabajo.

A la maestra Mónica Karina Pérez Pacheco, Dra. Karina Jiménez Durán y Dra. Clara Esquivel Huesca por sus valiosos consejos y apoyo en las técnicas de microscopía.

José Gonzalo Ricardo Wong, por el apoyo en campo y su valiosa ayuda en el laboratorio.

A la Maestra Reyna por su valioso apoyo para la obtención de microfotografías.

A la Unidad de Informática para la Biodiversidad (UNIBIO), Instituto de Biología UNAM, especialmente a Ubaldo Melo, por permitirme ser parte del proyecto proyecto KE002: “Digitalización y sistematización de las colecciones biológicas nacionales”, lo cual ha sido un apoyo para la culminación de éste trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Saúl porque sin él esto no sería posible, a sus padres Magabeli Nájera y Saúl Martínez porque han sido un apoyo incondicional para los dos.

A mi gran amigo Luis Ricardo Salas, ¡gracias por todo tu apoyo! Eres y serás siempre mi mejor amigo.

A Fanie por escucharme cuando te encontraba en la UNIBIO y por tu valiosa amistad.

A Jesica Jerónimo por su valiosa amistad en gran parte de la carrera.

## ÍNDICE

### DEDICATORIA

### AGRADECIMIENTOS

Resumen.....	7
<b>I. Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Antecedentes</b>	
II. I. Características generales de las angiospermas.....	9
II. II. Familia Podostemaceae.....	10
II.III. Morfología.....	14
II. IV. Reproducción sexual.....	14
II. V. Embriología.....	15
II.V.a. Óvulo.....	15
II. V.b. Saco embrionario.....	15
II. VI. <i>Oserya</i> Tul. & Wedd.....	17
<i>Noveloa coulteriana</i> (Tul.) C.T. Philbrick.....	19
Descripción botánica.....	19
Podostemaceae en México.....	19
<b>III. Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>IV. Objetivos</b>	
IV.I. Objetivo general.....	22
IV.II. Objetivos particulares.....	22
<b>V. Materiales y método</b>	
V.I. Colecta del material.....	23

V.II. Procesamiento del material para su observación al microscopio de luz.....	23
V.III. Procesamiento del material para su observación al microscopio electrónico de transmisión.....	24
V.IV. Pruebas histoquímicas .....	26
<b>VI. Resultados</b>	
VI.I. Observaciones en campo.....	28
VI.II. Morfología de la flor.....	32
VI.III. Estructura del óvulo de <i>Noveloa coulteriana</i> .....	32
VI.IV. Ultraestructura del óvulo de <i>Noveloa coulteriana</i> .....	33
VII. Discusión.....	42
VIII. Conclusiones.....	46
IX. Literatura consultada.....	47



## RESUMEN

La familia Podostemaceae es la más grande dentro de las angiospermas acuáticas estrictas, sus tallos y raíces presentan compresión dorsiventral, lo que ha ocasionado que sean confundidas con musgos, algas o líquenes. Crecen sumergidas en ríos y cascadas de corrientes rápidas, su ciclo de vida está relacionado con los niveles de agua de los ríos. La etapa vegetativa se desarrolla en la época de lluvias, mientras que la floración se presenta en la época seca del año. Las principales características que definen a la familia Podostemaceae son la presencia de un gametofito femenino tetracelular, un saco embrionario de tipo Apinagia (en la mayoría de las especies estudiadas) y un pseudosaco embrionario o plasmodio nucelar. Las investigaciones embriológicas en Podostemaceae son escasas y la gran mayoría de los trabajos han enfocado su interés en el desarrollo del saco embrionario y del plasmodio nucelar, dejando a un lado el óvulo en general. Dada la necesidad de la obtención de conocimientos acerca de las células que conforman el óvulo de *N. coulteriana* (Tul.) C. T. Philbrick se empleó la microscopía fotónica y la microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos permiten corroborar que *N. coulteriana* sigue los patrones reportados para las podostemáceas como un ovario bicarpelar con óvulos anátropos, bitégmicos y exóstomos. La epidermis interna del ovario se compone de células fisiológicamente activas con una gran cantidad de lípidos en su interior. El material de reserva es el almidón presente en los tegumentos del óvulo y la placenta. El saco embrionario es tetracelular compuesto por dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central.

## I. INTRODUCCIÓN

La familia Podostemaceae es la más grande y diversa entre las angiospermas acuáticas estrictas, se encuentra distribuida ampliamente en los ríos de los trópicos y subtrópicos de todo el mundo en un ambiente único para las angiospermas. Las podostemáceas son hierbas que crecen sumergidas en ríos con corrientes rápidas y cascadas, teniendo la capacidad de adhesión a los sustratos con ayuda de pelos unicelulares y un biopelícula de cianobacterias (Jäger-Zürn, 2000).

Estas plantas se han caracterizado por su inusual apariencia y su considerable diferencia con el resto de las angiospermas (Jäger-Zürn, 1997) presentan diversas adaptaciones morfológicas para colonizar el ambiente acuático.

El patrón de desarrollo embrionario en podostemáceas difiere de forma significativa del común de las angiospermas, y es de particular interés la presencia de sacos embrionarios de origen tetracelular y de un plasmodio nucelar o “pseudosaco embrionario”, que se desarrolla a partir de la nucela, así como la ausencia de endospermo (Murguía-Sánchez, 2003), lo que suscitó una gran controversia sobre la existencia de la doble fecundación, ya que una de las características (sinapomorfía) por las cuales se puede definir al grupo de plantas con flor, es la presencia de la doble fecundación con la correspondiente formación del endospermo.

Además de las características embriológicas que hacen únicos a este grupo de plantas, cabe mencionar que algunas especies de esta familia son de interés comercial; por ejemplo, las hojas de *Rhyncholacis* son utilizadas como condimento (Philbrick y Novelo 1995).

Y la tradición oral en algunos lugares, como el estado de Jalisco, indica que las hojas de algunas especies de *Marathrum* son usadas en infusiones para tratar enfermedades hepáticas. Así pues, la familia Podostemaceae resulta ser un grupo de plantas de sumo interés

Existen varias publicaciones sobre aspectos embriológicos de la familia (Mukkada, 1969; Arekal *et al.*, 1977; Jäger-Zürn, 1997; Murguía-Sánchez, 2001; 2002; 2003;; Sikoloia y Onyango, 2009; Bravo, 2011; Sehgal *et al.*, 2010; Villanueva, 2013; Chaudhary *et al.*, 2014); sin embargo, las observaciones fueron realizadas con microscopía fotónica y son muy escasas aquellas que utilizan el microscopio electrónico de transmisión (Jiménez-Durán *et al.*, 2010). En este trabajo se estudia el óvulo de *N. coulteriana* (Tul.) C. T. Philbrick un nuevo género de la subfamilia Podostemoideae, endémico de

México utilizando, el microscopio fotónico y el electrónico de transmisión, comparando los resultados con lo ya existentes para la subfamilia Podostemoideae en particular y Podostemaceae en general. Se genera así el primer reporte acerca de la ultraestructura del óvulo en *N. coulteriana*.

## II. ANTECEDENTES

### II.I. Características generales de las angiospermas

Las angiospermas o plantas con flor se clasifican dentro de la división Magnoliophyta (Baroux *et al.*, 2002); son el grupo evolutivamente más exitoso y diverso de las Embriophyta, con alrededor de 260 000 especies, distribuidas en 300 ó 400 familias aproximadamente; este número tan grande se debe a su éxito reproductivo y rápida diversificación. Los fósiles más antiguos aparecen en el Cretácico temprano, hace aproximadamente 130-136 millones de años (Soltis *et al.*, 1999), pero su rápida diversificación tuvo lugar durante el Cretácico medio (Willis y McElwain, 2002).

La flor es una de las características distintivas de las angiospermas y en ella se localizan los órganos involucrados en los procesos de esporogénesis, fecundación, y formación del fruto y la semilla. Una de las características principales por las que se puede definir al grupo de las angiospermas es la presencia de la doble fecundación con la formación de endospermo; la cual fue descubierta por Nawaschin (1898) en las especies *Lilium martagon* y *Fritillaria tenella* (Liliaceae) (Raghavan, 2003).

La ovocélula y la célula central, forman parte del gametofito femenino en el interior del óvulo, mientras que las células espermáticas se originan a partir de la célula generatriz en el grano de polen (Raghavan, 2003; McCauley *et al.*, 2013).

La doble fecundación representa la fusión de las células espermáticas; de las cuales el núcleo de una de ellas se fusiona con la ovocélula o gameto femenino originando el embrión (singamia) y el núcleo de la otra célula espermática se une a los núcleos polares de la célula central formando el endospermo (triple fusión).

El gametofito femenino en las angiospermas, recibe también el nombre de saco embrionario ó megagametofito; generalmente está formado por siete células y ocho núcleos; este tipo de saco embrionario se presenta aproximadamente en el 70% de las angiospermas, conocido como de tipo *Polygonum* (Figura 1), debido a que fue descrito por primera vez en la especie *Polygonum*

*divaricatum* L. (Maheshwari, 1948; Raghavan, 2003). Se pueden encontrar variantes del desarrollo del saco embrionario y esto depende tanto del número de núcleos de megasporas que lo originan, como del número final de células que lo forman (Baroux *et al.*, 2002).

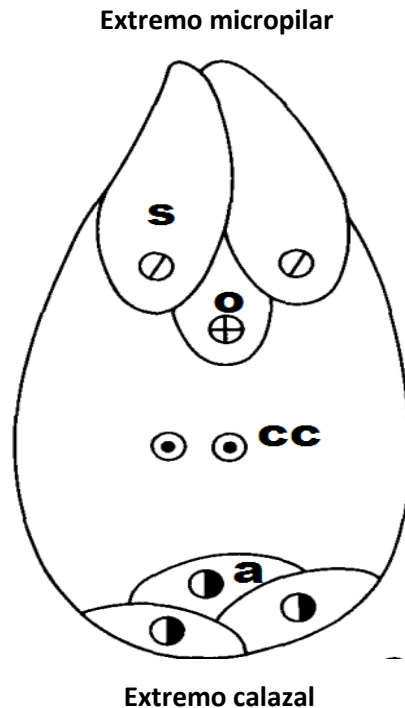


Figura 1. Esquema del gametofito femenino tipo *Polygonum*, compuesto por siete células y ocho núcleos. s= sinérgidas; o=ovocélula; cc= célula central; a= antípodas (Modificado de Haig, 1990).

## II.II. Familia Podostemaceae Rich. Ex Kunth

Las relaciones filogenéticas de la familia Podostemaceae se encuentran sustentadas por datos morfológicos y análisis moleculares de los fragmentos ribosomales *rbcL*, y *18S*, sugiriendo que la familia pertenece al orden Malpighiales y las familias más relacionadas filogenéticamente son: Calophyllaceae e Hypericaceae, siendo ésta última el grupo hermano de las podostemáceas (Figura 2) (Soltis *et al.*, 1999; Kita y Kato, 2001; Typpery *et al.*, 2011; APG, 2013).

La familia, cuenta con 48 géneros y alrededor de 270 especies que en su mayoría son monotípicas (Cook, 1996).

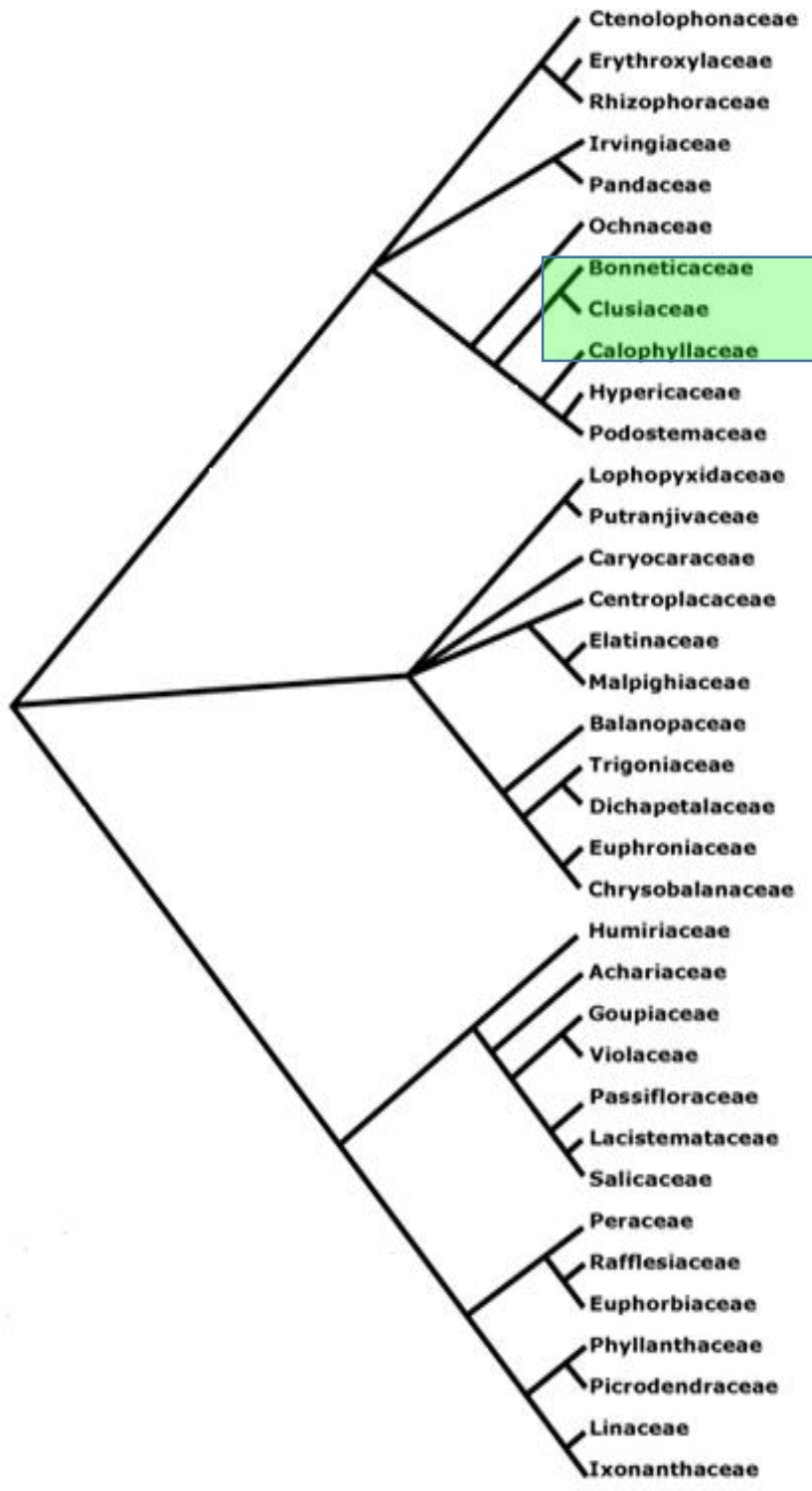


Figura. 2. Relaciones filogenéticas de la familia Podostemaceae (Modificado de APG, 2013).

Van Royen (1954) inicialmente dividió a la familia en dos subfamilias, Podostemoideae, constituida aproximadamente por 40 géneros y Tristichoideae, compuesta por cinco géneros, incluyendo al género *Weddellina*. Actualmente, los géneros de la familia se encuentran distribuidos en tres subfamilias: Tristichoideae con cinco géneros, Podostemoideae con 42 géneros y Weddellinoideae que contiene el género monoespecífico *Weddellina* (Philbrick y Novelo, 1995; Cook, 1996; Tippery *et al.*, 2011).

Los caracteres que permiten reconocer a las subfamilias Tristichoideae, Podostemoideae y Weddellinoideae son, principalmente, el número de carpelos y de estigmas en la flor, presencia o ausencia de estilo, tiempo de formación de los tegumentos y del plasmodio nucelar, así como el tipo de células nucleares que participan en el desarrollo del plasmodio nucelar (Murguía-Sánchez, 2003).

Su distribución se encuentra limitada a los trópicos y subtrópicos de todo el mundo; existiendo una gran cantidad de géneros y especies endémicas a un solo río o sistema de ríos (Rutishauser, 1997; Novelo y Philbrick, 2000). Representantes de la subfamilia Tristichoideae se pueden encontrar en el este de Asia, al noroeste de Australia, África y América (Figura 3), la subfamilia Podostemoideae presenta una distribución pantropical (Figura 4) y la subfamilia Wedellenideae se localiza en el norte de Sudamérica (Figura 5) (Philbrick y Novelo, 1994; 1995; APG, 2013).

En América las podostemáceas se encuentran distribuidas desde México hasta el noroeste de Argentina (Philbrick y Novelo, 1995). Para México se han reportado cinco géneros y nueve especies, de las cuales un género y tres especies son endémicas (Novelo y Philbrick, 1997, 2000; Reyes-Ortega *et al.*, 2009). Las podostemáceas crecen en la superficie de las rocas sumergidas en corrientes rápidas y en cascadas, presentándose en un rango de temperatura de 14 a 27 °C, alcanzando profundidades de hasta 100 cm. Se encuentran comúnmente en ríos oligotróficos, pero algunas especies son capaces de soportar niveles de contaminación considerables, en especial en la época de secas, cuando el nivel del agua en los ríos se encuentra bajo (Quiroz *et al.*, 1997).

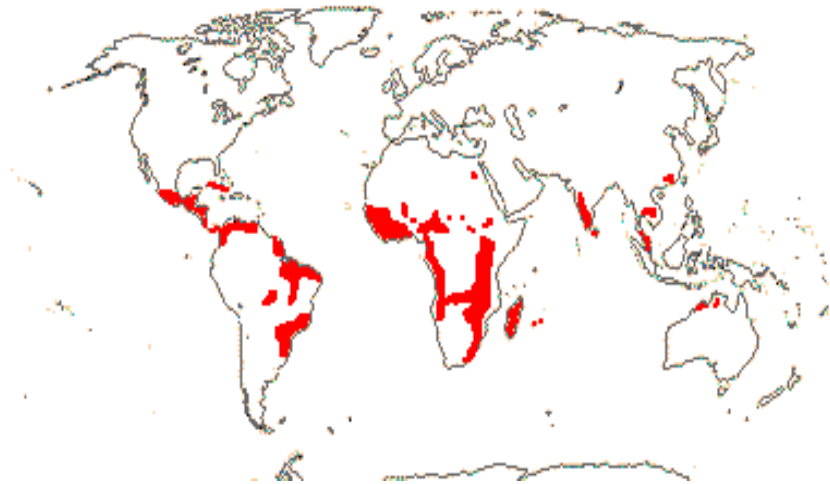


Figura 3. Mapa de distribución de la familia Tristichoideae (Tomado de APG, 2013).



Figura 4. Mapa de distribución de la subfamilia Podostemoideae (Tomado de APG, 2013).



Figura 5. Mapa de distribución subfamilia Wedellinoideae (Tomado de APG 2013).

### **II.III. Morfología**

Las podostemáceas se caracterizan por su considerable diferencia con el resto de las angiospermas (Jäger-Zürn, 1997) debido a sus diversas adaptaciones morfológicas, las cuales les han permitido colonizar el ambiente acuático. Presentan un cuerpo vegetativo originado por la compresión dorsiventral de las raíces, de los tallos, o de ambos provocando que sean confundidas con líquenes, algas y musgos (Rutishauser, 1997; Rutishauser *et al.*, 1999; Sehgal *et al.*, 2007, Katayama *et al.*, 2011). Las podostemáceas pueden adherirse al sustrato gracias a la presencia de pelos unicelulares en la parte ventral del tallo taloide, los cuales interactúan con los polisacáridos producidos por cianobacterias presentes en el sustrato, formando lo que se conoce como biopelícula (Jäger y Zürn, 2000).

### **II. IV. Reproducción sexual**

Las podostemáceas poseen los órganos vegetativos sumergidos en el agua y anclados al sustrato rocoso, presentando su máximo desarrollo vegetativo en la temporada de lluvias (Philbrick y Novelo, 1995; Luna, 2006; 2010).

La época de floración inicia cuando baja el nivel del agua en los ríos y quedan expuestas las flores (Philbrick y Novelo, 1994). La polinización y la fecundación se presentan inmediatamente después de este periodo. La floración y la germinación están correlacionadas con la estación lluviosa, y las semillas germinan hasta la siguiente temporada de lluvias.

Los botones florales que se encuentran inmersos en el tallo de la planta salen a la superficie por elongación de los pedicelos, lo que originará una antesis aérea, presenta reducción floral, en donde las partes florales tienden a disminuir en número y tamaño, aunque son perfectas (Murguía-Sánchez *et al.*, 2001; 2002; Luna, 2006).

Esta familia, en contraste con la mayoría de las angiospermas acuáticas, tiene una gran producción de flores, frutos y semillas (Philbrick y Novelo, 1997), lo que implica que su reproducción es fundamentalmente sexual, a diferencia del resto de las plantas acuáticas, que se reproducen mayormente por vía asexual. Los frutos se desarrollan fuera del agua, una vez que la parte vegetativa se ha secado.



Las flores de las podostemáceas son hermafroditas y el perianto suele estar muy reducido o en su caso ausente. De manera usual los estambres están asociados a tépalos, que son pequeños o ausentes, sólo existe un pistilo y son principalmente casmógamas, aunque puede haber cleistogamia bajo el agua (Novelo y Philbrick, 1993; 1997; Philbrick y Novelo, 1998; Novelo y Philbrick, 2000; Philbrick *et al*, 2006; Khosla *et al.*, 2009). Los síndromes de polinización presentes en esta familia son la anemofilia o entomofilia y en algunas ocasiones puede ocurrir autogamia (Jäger-Zürn, 1997).

## **II. V. Embriología**

En la primera década del siglo XX se estableció que en el óvulo se localizan los caracteres embriológicos que definen a la familia Podostemaceae.

Durante el desarrollo del óvulo, se observa la formación de un pseudosaco embrionario (también llamado plasmodio nucelar), a causa de la degradación de las paredes celulares de las células nucleares y se le consideró como un reservorio ideal de agua, por esta razón se acuñó el término de plasmodio nucelar, para precisar que esta estructura tiene su origen a partir de la nucela. Así el plasmodio nucelar aparentemente substituye la función del endospermo ya que en ausencia de éste, se encarga de nutrir al saco embrionario y posteriormente al embrión (Arekal y Nagendran, 1977; Murguía-Sánchez, 2003; Katayama *et al.*, 2011).

### **II. V.a. Óvulo**

Los óvulos en la familia Podostemaceae se reportan como anátropos, bitégmicos y tenuinucelados; el tegumento interno es más corto que el tegumento externo (Mukkada, 1969; Arekal y Nagendran, 1977; Jäger-Zürn, 1997; Murguía-Sánchez *et al.*, 2001, 2002; Ameka *et al.*, 2002; Razi, 1949; Sehgal *et al.*, 2010; Chaudhary *et al.*, 2014).

### **II.V.b. Saco embrionario**

Trabajos previos reportan que, para la gran mayoría de las especies estudiadas hasta el momento de la familia Podostemaceae, los sacos embrionarios son tetracelulares, formados por dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central con un solo núcleo, las cuales pueden tener algunas variaciones dependiendo del origen y tipo de desarrollo (Arekal y Nagendran, 1977; Cook y Rutishhauser, 2007; Razi,

1949; Sehgal *et al.*, 2010; Chaudhary *et al.*, 2014). Todos estos estudios han usado la microscopía fotónica y para algunas especies se han reportado diversos tipos de desarrollo del saco embrionario, como el tipo Apinagia (Figura 6a) en donde el saco embrionario se desarrolla por dos divisiones mitóticas del núcleo funcional de la díada (producto de la meiosis I), el cual está formado por dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central con un solo núcleo, que aparentemente no tiene función (Nagendran *et al.*, 1977).

El tipo Podostemum (Figura 6b) es bispórico, es decir son los dos núcleos de la díada calazal los que intervienen en su formación. En este tipo de desarrollo, sólo se lleva a cabo una división mitótica, dando origen a dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central con un núcleo, que también parece ser no funcional. El tipo Polypleurum (Figura 6c) también es bispórico y está formado por una sinérgida, la ovocélula y dos células hacia el extremo calazal (Nagendran *et al.*, 1977).

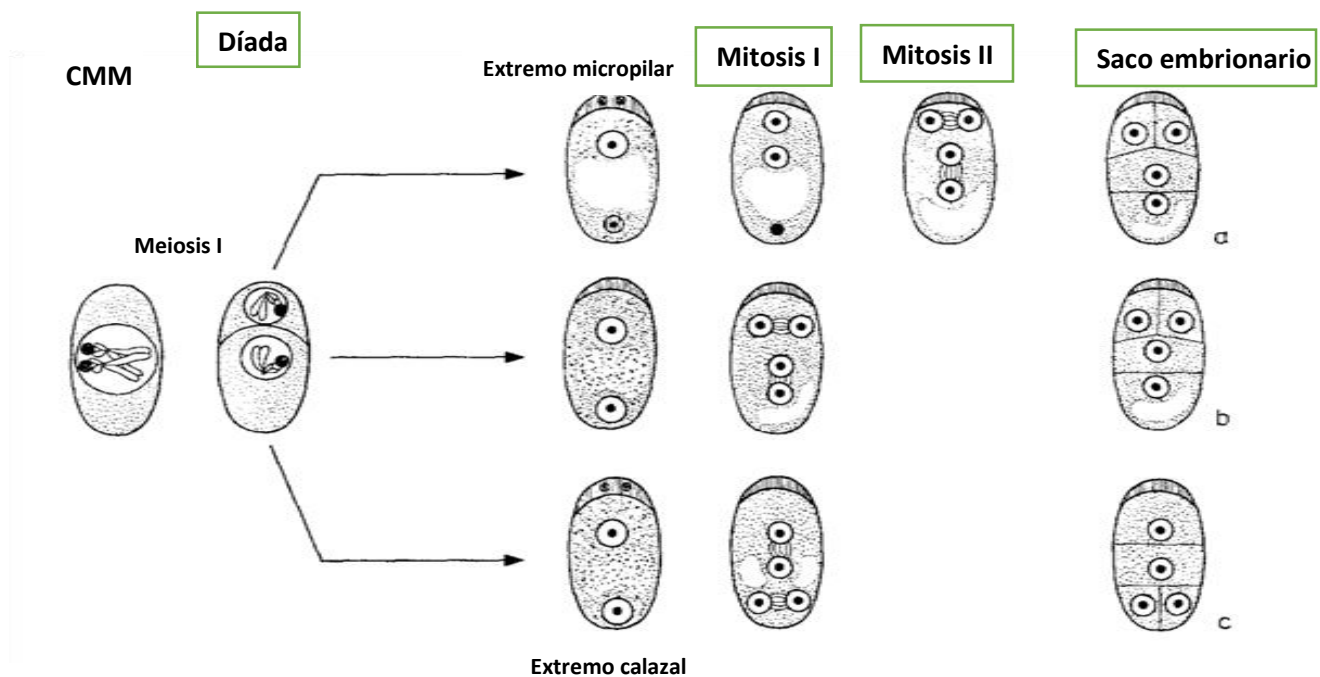


Figura 6. Representación de los diferentes tipos de desarrollo del saco embrionario en miembros de la familia Podostemaceae. a= Apynagia, b= Podostemum, c=Polypleurum. Tomado de Nagendran *et al.*, 1977.

## II. VIII. *Oserya* Tul. & Wedd.

*Oserya* es un género neotropical descrito por Tulasne en 1849 (Tipperry *et al.*, 2011); se trata de un género americano, de seis especies, de las cuales cinco se distribuyen en el norte de Brasil y al noroeste del sur de América. *Oserya* es disyunta geográficamente; su rango norte incluye centro y sur de México, mientras que su distribución al sur es predominante en el norte de Sudamérica. La especie se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm.

El género contiene especies anuales o perennes. Son hierbas pequeñas, con raíces alargadas, postradas y aplanadas. Los tallos surgen lateralmente a lo largo de las raíces, opuestos o subopuestos. Hojas dísticas; pecíolo cilíndrico o aplanado, hoja repetidamente bifurcada, a veces con una vaina y una estípula interpeciolar. Flores hermafroditas, zigomorfas, pediceladas, solitarias, axilares, cubiertas por una espátula en forma de saco o en forma de clava. Tépalos dos, con apariencia escamosa. Estambres uno a dos, deciduos; anteras basifijas, con dehiscencia introrsa, extrorsa a lateral. Polen liberado en mónadas. Ovario bilocular, con dos carpelos desiguales. Estigmas dos, libres o basalmente fusionados, cónicos; óvulos numerosos; placenta axilar. Cápsula bilocular, con dos valvas desiguales, una de las valvas a veces caduca, 6 a 14 costillas, los márgenes de su sutura engrosados. Semillas numerosas (Cook, 1996).

En análisis filogenéticos recientes (Tipperry *et al.*, 2011) se ha puesto de manifiesto que la clasificación tradicional basada sólo en caracteres morfológicos no es útil para el reconocimiento de grupos en Podostemaceae. Tomando en cuenta la propuesta de Tipperry (Tipperry *et al.*, 2011) basada en una combinación de datos moleculares y morfológicos (ITS, *rbcl*, *trnL*), el género refleja una disyunción mexicana/sudamericana (Figura 7) y en cuanto a los caracteres morfológicos, las especies mexicanas presentan anteras dehiscentes, introrsas o latrorsas, uno a tres (*O. coulteriana*) o dos (*O. longifolia*) estambres por flor, y cápsulas con seis costillas sin sutura. En contraste con las especies sudamericanas de *Oserya* que presentan anteras con dehiscencia extrorsa, un solo estambre y diez costillas sin sutura. Debido a las diferencias mencionadas entre los miembros de *Oserya* en México, comparadas con las sudamericanas, Tipperry *et al.*, (2011) estableció un nuevo género con dos especies para los miembros de *Oserya* distribuidos en México: *Noveloa coulteriana* y *Noveloa longifolia*.

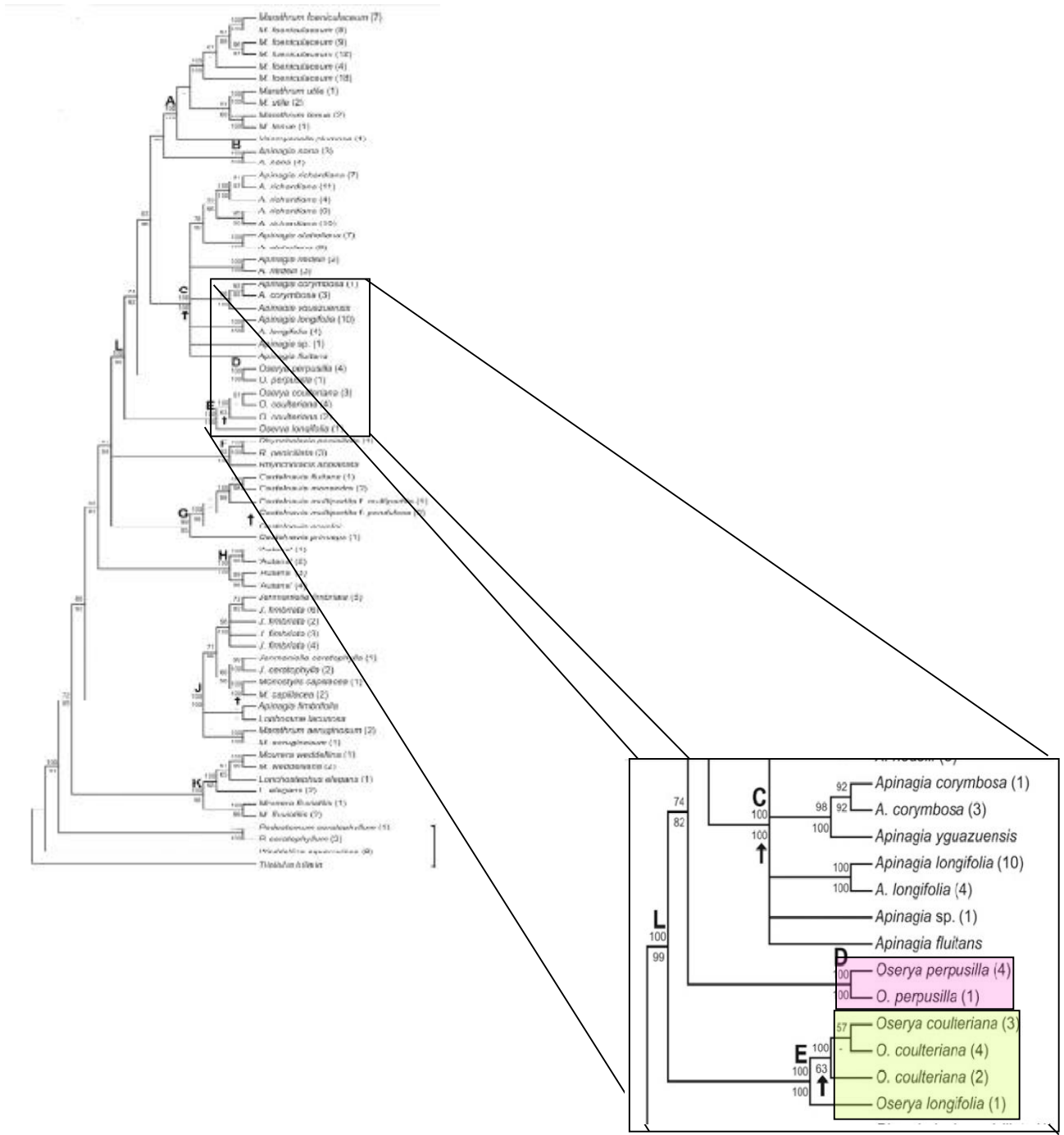


Figura 7. Consenso estricto de los árboles más parsimoniosos obtenido del análisis combinado de los marcadores moleculares ITS, *rbcl*, *trnL* (Modificado de Tippery *et al.*, 2011).

***Noveloa coulteriana* (Tul.) C. T. Philbrick** (Antes *Oserya coulteriana* Tul.)

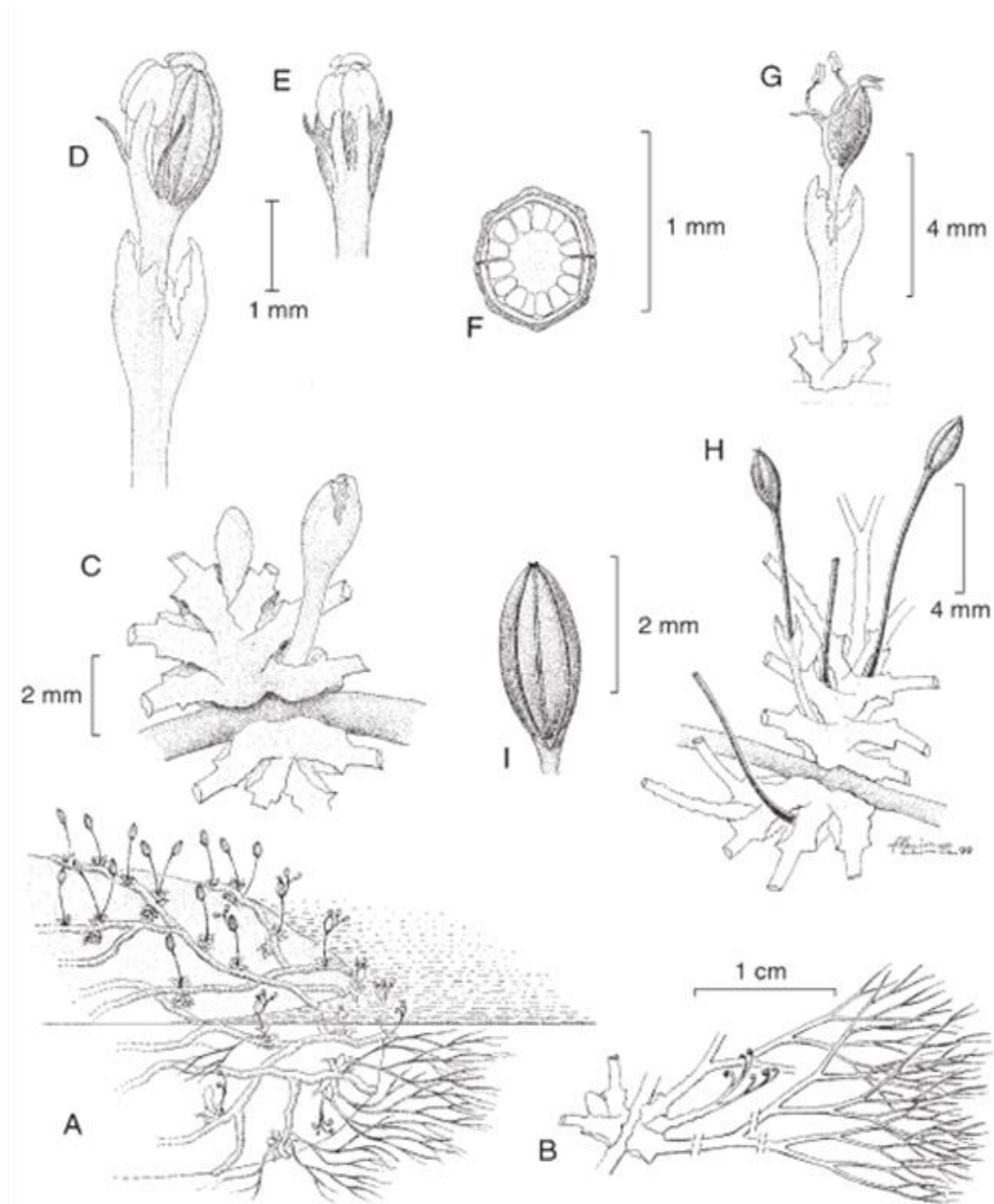
*Noveloa coulteriana* es endémica de México. Se distribuye en la vertiente del Pacífico, desde Sonora hasta Guerrero, Morelos y en Baja California Sur. La especie se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm.

### **Descripción botánica**

Plantas anuales o perennes, raíces postradas y aplanadas, de hasta 15 cm de largo, 0.5 a 1.8 mm de diámetro; hojas 2 a 10 cm de largo; pecíolos aplanados; lámina 3 a 5 veces dividida, las últimas divisiones 0.1 a 0.3 mm de ancho, ápice agudo; tépalos 3, subulados, tépalos laterales 0.7 a 1.5 mm de largo, tépalos sobre el andropodio 0.4 a 0.8 mm de largo; estambres 2; andropodio 0.9 a 1.5 mm de largo, filamentos 0.4 a 1.4 mm de largo; anteras 0.4 a 1.1 mm de largo; estigmas 0.2 a 0.6 mm de largo; pedicelos 1.5 a 7 mm de largo; cápsulas 1.6 a 2.8 mm de largo y 0.8 a 1.2 mm de diámetro; valvas con tres costillas; en promedio 30 semillas por cápsula (Cook, 1996) (Figura 8).

### **II.IX. Podostemáceas en México**

En México se presentan cuatro géneros y nueve especies de podostemáceas: *Marathrum* Humb y Bonpl. (*M. rubrum* Novelo & C.T. Philbrick, *M. schiedeanum* (Cham.) Tul., *M. tenue* Liebm, *M. plumosum* Novelo y Philbrick), *Noveloa* Tul y Wedd (*N. coulteriana* Tul, *N. longiflora* Novelo y Philbrick), *Podostemum* Michx (*P. ricciiforme* (Liebm) P. Royen) y *Tristicha* Du Petit-Thouars (*T. trifaria* (Bory ex Willd) Spreng) (Novelo y Philbrick, 1997, Tippery *et al.*, 2011).



**Figura 8.** *Noveloia coulteriana*. A. Aspecto general de la planta; B. Detalle de una raíz de donde emergen nuevos vástagos con hojas sumergidas; C. Dobles vainas de las hojas de donde emergen las flores; D. Flor joven surgiendo de la espata; E. Flor joven vista desde la perspectiva del androceo; F. Corte transversal del ovario; G. Flor madura; H. Planta expuesta con frutos maduros; I. Detalle de la cápsula (Tomado de Novelo y Philbrick, 2000).

### III. JUSTIFICACIÓN

Los estudios embriológicos de los miembros mexicanos de la familia Podostemaceae son escasos; existen algunos trabajos que involucran al nuevo género *Noveloa* (Podostemoideae), pero la mayoría de ellos son taxonómicos, ninguno de ellos hace énfasis en la estructura del óvulo y su relación con la pared del ovario en flores en anthesis.

El óvulo y en particular el saco embrionario que se localiza dentro del óvulo, son estructuras muy pequeñas. Su reducido tamaño hace necesario utilizar para su estudio otras técnicas, aparte de la microscopía fotónica. Es en estos casos donde la microscopía electrónica de transmisión se hace indispensable.

*Noveloa coulteriana* es una especie de la cual se tiene muy poco conocimiento sobre la estructura y ultraestructura del óvulo, a pesar de ser una fuente muy importante de caracteres taxonómicos y reproductivos.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV. I. Objetivo general**

Describir la estructura y ultraestructura del óvulo de *Noveloa coulteriana*.

### **IV. II. Objetivos particulares**

- ✓ Conocer el tipo de óvulo que presenta *Noveloa coulteriana*.
- ✓ Identificar las estructuras que almacenan el material de reserva.
- ✓ Describir las células que conforman al óvulo de *Noveloa coulteriana*.
- ✓ Identificar las células que componen el saco embrionario de *Noveloa coulteriana*.
- ✓ Relacionar al óvulo con el pericarpio.
- ✓ Relacionar el tamaño del fruto con la producción de semillas



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.I Colecta del material

Se realizaron dos colectas; una en enero del 2012 y la otra en enero del 2013 en los ríos Horcones, Municipio de Cabos Corrientes ( $20^{\circ}27'12.1''N$ ,  $105^{\circ}17'23.9''O$ ; 371msnm); y Las Juntas del sur, Municipio de Cabo Corrientes, Jalisco ( $20^{\circ}14'43.6''N$ ,  $105^{\circ}18'42.2''O$ , 347 msnm) (Figura 9). El material biológico consistió de flores en antesis y frutos.

De 20 frutos deshidratados se contabilizaron el número de semillas para obtener una relación del número de semillas con el tamaño del fruto.



Figura 9. Mapa de los ríos Las juntas del sur y Río Horcones, localidades en donde se colectó *Noveloa coulteriana*.

### Tratamiento de muestras

#### V.II. Procesamiento del material para su observación al microscopio de luz.

##### Fijación

Las flores en antesis de *Noveloa coulteriana* se fijaron *in situ* en una mezcla de FAA: (10% de formaldehído, 5% de ácido acético glacial, 50% de etanol y 35% de agua destilada).

### **Deshidratación**

La deshidratación se realizó de manera gradual en una serie de etanol (30%, 40%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%), las muestras se mantuvieron por una hora en cada alcohol y dos horas en alcohol al 100%.

### **Infiltración**

Las flores en antesis se incluyeron en una mezcla de LR-White puro (resina hidrofílica) y alcohol absoluto 2:1, 1:1, 1:2 una hora en cada uno y el último cambio fue de 48 horas; en refrigeración.

### **Inclusión**

El material se incluyó en LR-White en cápsulas de gelatina.

### **Cortes**

Los bloques incluidos en LR-White se cortaron en un ultramicrotomo de rotación (RMC-MT990), donde se obtuvieron cortes semifinos de entre 300 y 1000 nm de grosor y los cuales se tiñeron con azul de toluidina al 0.4 %. Estos cortes fueron observados en un microscopio óptico.

## ***V.III. Procesamiento del material para su observación al MET.***

### **Fijación**

El material se fijó en una mezcla de glutaraldehído-paraformaldehído (3.5-4%) en amortiguador de fosfatos (PBS) 1M pH 7.2 a 4 °C, después de 24 horas de fijación, se realizaron 6 enjuagues con PBS con agua destilada y se mantuvieron a 4 °C, posteriormente se postfijó con tetraóxido de osmio (1%), durante dos horas a temperatura ambiente.

### **Deshidratación**

La deshidratación se realizó de manera gradual en una serie de etanol (30%, 40%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) se mantuvieron una hora en cada uno (Lux, 1994; Figura 10).

### **Infiltración**

Las flores en antesis se disectaron; se removieron los estambres. El material se incluyó en Epón (resina hidrofóbica), se utilizó como agente intermediario el óxido de propileno. Se realizaron cuatro cambios de óxido de propileno por 20 minutos cada uno, posteriormente se infiltró en una mezcla de óxido de

propileno-Epón (7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1) por 24 horas en cada cambio a 4 °C y un último cambio de Epón puro.

### **Inclusión**

El material se incluyó en LR-White en cápsulas de gelatina.

### **Cortes**

Los bloques incluidos en Epón se cortaron en un ultramicrotomo, donde se obtuvieron cortes semifinos de entre 300 y 1000 nm de grosor, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina para poder localizar la zona de estudio (óvulos, sacos embrionarios). Una vez localizada la zona de estudio se detalló para la obtención de cortes ultrafinos de entre 60 -70 nm con una cuchilla de diamante. Los cortes obtenidos se colocaron en rejillas de cobre de 150 barrotes, previamente cubiertas con una membrana de formvar al 0.3%.

### **Contrastación**

Se contrastó con compuestos químicos de elevado número atómico, como el acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo al 0.3%. El contraste de la muestra se realizó por flotación; se colocó una gota de acetato de uranilo en una lámina de parafilm colocada dentro de una caja petri cubierta por papel filtro, la rejilla se colocó en la gota por 20 minutos posteriormente se retiró y se lavó con agua destilada (40 gotas), se colocó la rejilla en una caja Petri con papel filtro para secarse.

Para el citrato de plomo se colocó una lámina de parafilm en una caja petri, posteriormente colocar una gota de citrato de plomo y flotar la rejilla por 10 minutos posteriormente se lavó con agua destilada (40 gotas). La caja petri contenía algodón húmedo para crear una cámara húmeda y grajeas de NaOH para captar el CO<sub>2</sub> y evitar que se precipitara.

Las rejillas obtenidas se observaron en un microscopio electrónico JEM-1010 a 80 KV

#### ***V.IV. Pruebas histoquímicas***

- Prueba de lugol para determinar almidón (López et al., 2005). Cortes en LR-White se les aplico lugol, se lavaron e inmediatamente se observaron al microscopio óptico.
- Prueba rojo "o" de aceite para reservas lipídicas, cutina y suberina. A cortes en LR-White se les aplico rojo "o" de aceite durante 25 min. Se enjuago con alcohol al 50% y un segundo enjuague con alcohol al 30%, posteriormente se realizó un último enjuague con agua. Se montó en jalea glicerizada, previamente fundida en baño María. Se observaron al microscopio óptico

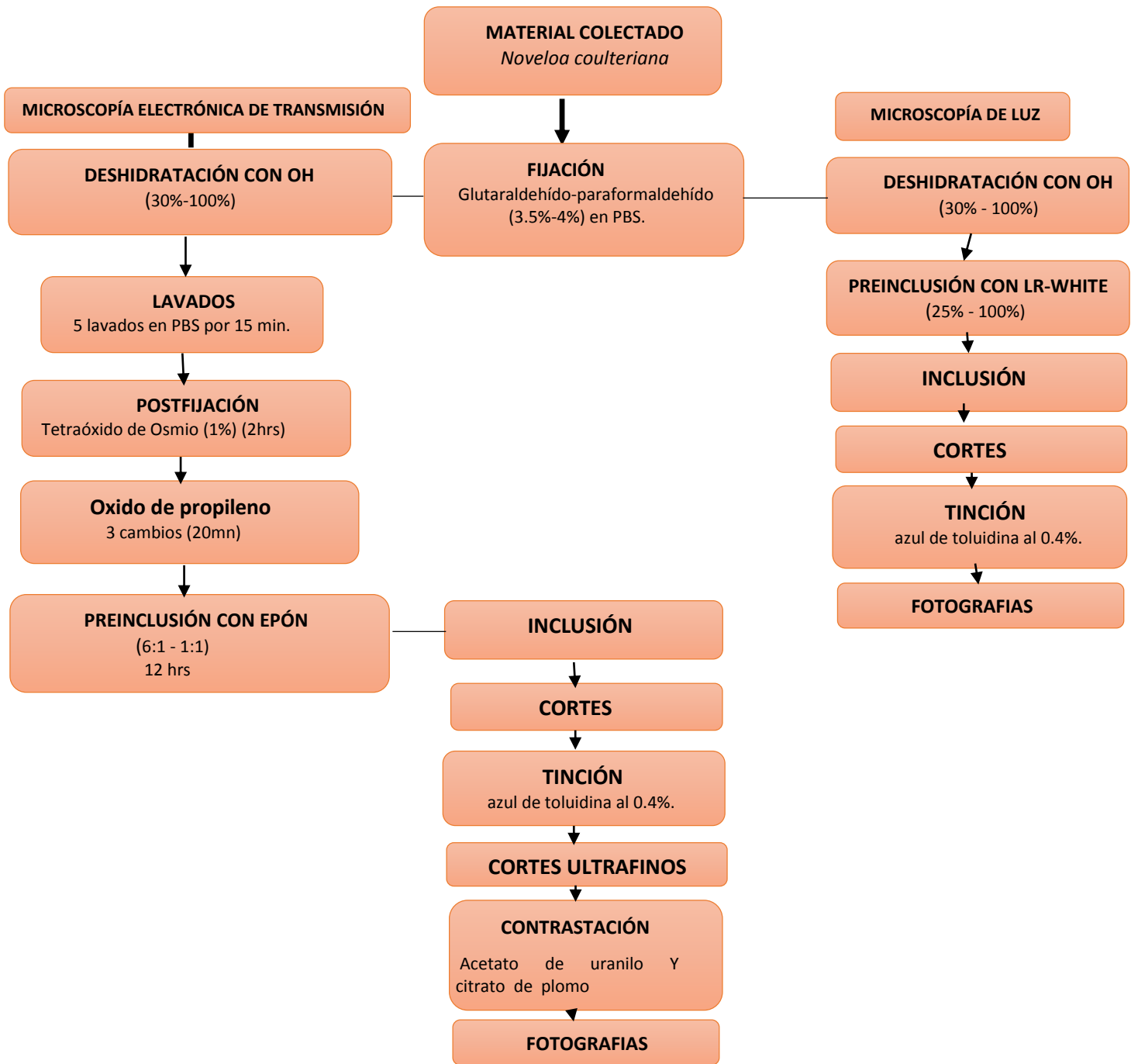


Figura 10. Procesamiento de óvulos de *Noveloa coulteriana*

## VI. RESULTADOS

### VI.I. Observaciones en campo

*Noveloa coulteriana* es una especie endémica de México. Habita ríos de corrientes rápidas con sustrato rocoso de origen granítico y con una gran incidencia de sol sobre las rocas. Crece formando parches en las partes bajas de las rocas, donde cohabita con otras especies de podostemáceas como son *Tristicha trifaria*, *Marathrum rubrum* y *Marathrum plumosum* (Figura 11 y 12A). Cuando comparte la roca con otras podostemáceas, siempre se le ha observado creciendo en la parte inferior de la roca, junto con *Tristicha trifaria*. En las partes superiores siempre se encuentran especies de *Marathrum* y *Vanroyenella*.

La fase vegetativa se desarrolla bajo el agua; durante la época lluviosa del año inicia el crecimiento vegetativo y formación de botones florales inmersos en el tallo, las hojas que caracterizan a *N. coulteriana* son dísticas, las cuales puede apreciarse en la parte vegetativa (Figura 12B).

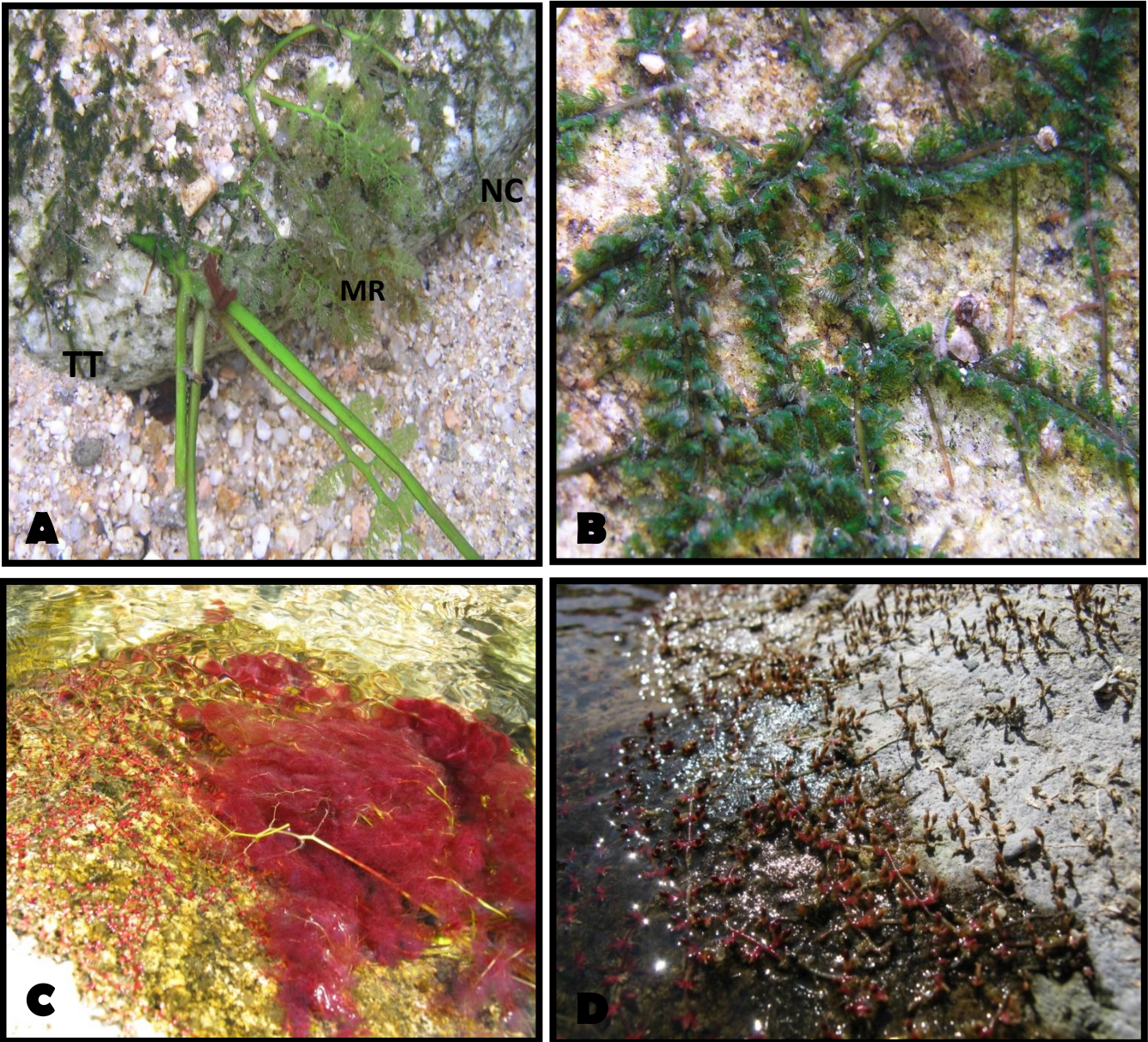
Aunque las condiciones climáticas en las dos localidades son similares, se pudo apreciar que *N. coulteriana* adquiere dos colores distintos (rojo y verde), dentro del mismo río o en distintos ríos (Lámina 12B y 12C).

La floración de *N. coulteriana* tiene lugar en la temporada seca del año (diciembre- enero, a veces febrero), y está correlacionada con los niveles de agua presentes en los ríos; cuando baja el nivel del agua los botones florales quedan expuestos al ambiente aéreo y es hasta entonces cuando se rompe la espátula y comienza la elongación de pedicelos y pueden observarse flores en antesis y frutos. La floración también es asincrónica aún en una misma roca, se pueden apreciar distintas etapas de desarrollo, desde botones florales dentro de la espátula pegados al tallo, hasta frutos maduros de color café y con el pedicelo muy adelgazado (Figura 12D y 13).



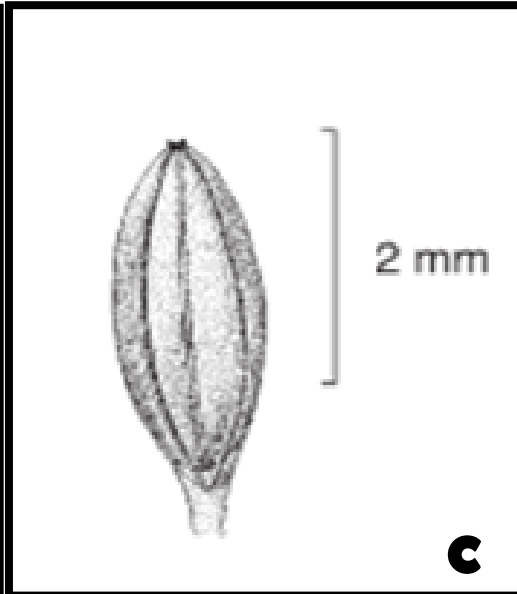
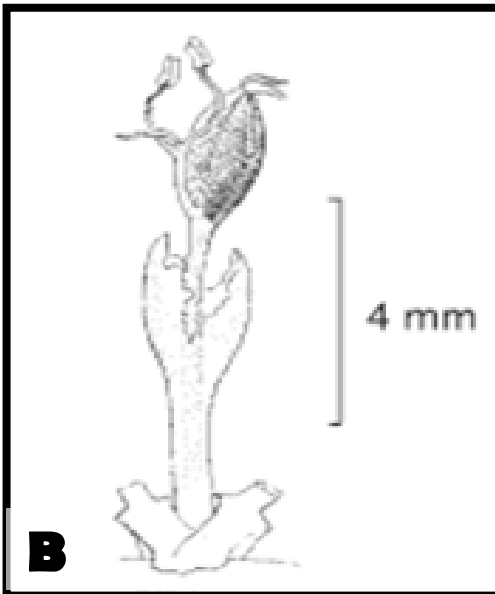
**Figura 11** Hábitat de *Novelloa coulteriana*. **A.** Río Los Horcones. **B.** Río juntas del Sur. **C.** Creciendo sobre el sustrato rocoso.

**D.** Parte vegetativa y reproductiva expuesta al medio aéreo.



**Figura 12.** *Noveloa coulteriana* **A)** Asociación con otras especies de la misma familia. **B)** Cuerpo vegetativo sumergido **C)** Etapa en donde comienza a bajar el nivel del agua junto con otras Podostemaceae. **D)** Flores en anthesis y frutos sobre la roca, por encima del nivel del agua **TT:** *Tristicha trifaria*, **MR:** *Marathrum rubrum*, **NC:** *Noveloa coulteriana*.





**Figura 13. A)** Flores en antesis de *Noveloa coulteriana*. **B)** Esquemas de flor emergiendo del andropodio **C)** Fruto (Tomado de Novelo y Philbrick, 2000)

## **VI.II. MORFOLOGÍA DE LA FLOR Y EL FRUTO**

La flor en antesis es una flor pequeña, de aproximadamente 2 mm de longitud. Se trata de una flor hermafrodita asociada a dos tépalos laterales y un tépalo en la base del andropodio un poco menor que los otros, presentan un color verde-rosado. Después de la fecundación y a medida que avanza la maduración del fruto, éste se torna de un color verde muy claro, que va cambiando hasta tornarse de un color café oscuro que corresponde a un fruto maduro. Las anteras en esta etapa han desaparecido o se encuentran secas pegadas al fruto que mide aproximadamente 2 mm (Figura 14A).

## **VI.III. ESTRUCTURA DEL OVARIO Y ÓVULO**

### **OVARIO**

El ovario es bilocular, evidentemente separado por un septo delgado, a cuyos lados se extiende la placenta, formada por células parenquimáticas con paredes celulares primarias muy delgadas. La placentación es axilar, con células que contienen abundantes reservas de almidón (Figura 14B).

La pared del ovario está formada aproximadamente por cinco estratos celulares. Consiste de una epidermis externa, con una cutícula sobre un estrato de células epidérmicas que no dejan espacios entre ellas, subepidérmicamente se encuentran unos tres o cuatro estratos de células parenquimáticas con muchas inclusiones de oxalato (drusas) y la capa adyacente a la epidermis interna de células parenquimáticas con contenido morfológicamente distinto a las otras células del parénquima probablemente lípidos (Figura 14C). La epidermis interna, también monoestratificada, con gran cantidad de lípidos, con una cutícula muy gruesa en la superficie que se ubica hacia el lóculo (Figura 14D).

### **ÓVULO**

El óvulo es anátropo, bitégmico, exóstomo y casi sésil (Figura 15A). Se producen aproximadamente de 15 a 20 óvulos por ovario unidos a la placenta, mediante un casi imperceptible funículo compuesto por tres estratos celulares (Figura 15B).

El tegumento interno se compone de dos a tres estratos celulares, de células con paredes celulares primarias, uninucleadas que en su interior contienen menor cantidad de almidón en comparación con el tegumento externo (Figura 15C).

El tegumento externo se compone de tres a cuatro estratos de células, con células isodeamétricas, uninucleadas con paredes celulares primarias muy delgadas; en su interior hay almacenadas grandes cantidades de almidón. Es el tegumento externo quien forma el micrópilo (Figura 15D).

### **Nucela**

La nucela en etapa de flores en anthesis está completamente degradada (Figura 15D).

## **VI.IV. ULTRAESTRUCTURA DEL OVARIO Y ÓVULO**

### **OVARIO**

La epidermis externa está compuesta de células anticlinalmente alargadas, con paredes celulares primarias, aparentemente con poca actividad celular. La epidermis interna está compuesta de células de forma tubular, poseen paredes celulares primarias y un contenido denso, homogéneo, que ocupa casi todo el lumen celular, de naturaleza lipídica (comunicación personal de Claudia Espinoza, reacción positiva al rojo o de aceite), una cutícula muy gruesa, en comparación con la de la epidermis externa formada por varias "lamelas" de cutina. Adyacente a la epidermis interna, existe una capa de células parenquimatosas, de morfología diferente al resto del parénquima que también contienen acumulaciones lipídicas y otras sustancias de naturaleza desconocida (Figura 16).

### **ÓVULO**

El tegumento externo está formado por células del tegumento externo son células parenquimáticas, de paredes primarias muy delgadas, que presentan un núcleo conspicuo localizado centralmente y un citoplasma con gran cantidad de inclusiones (Figura 17).

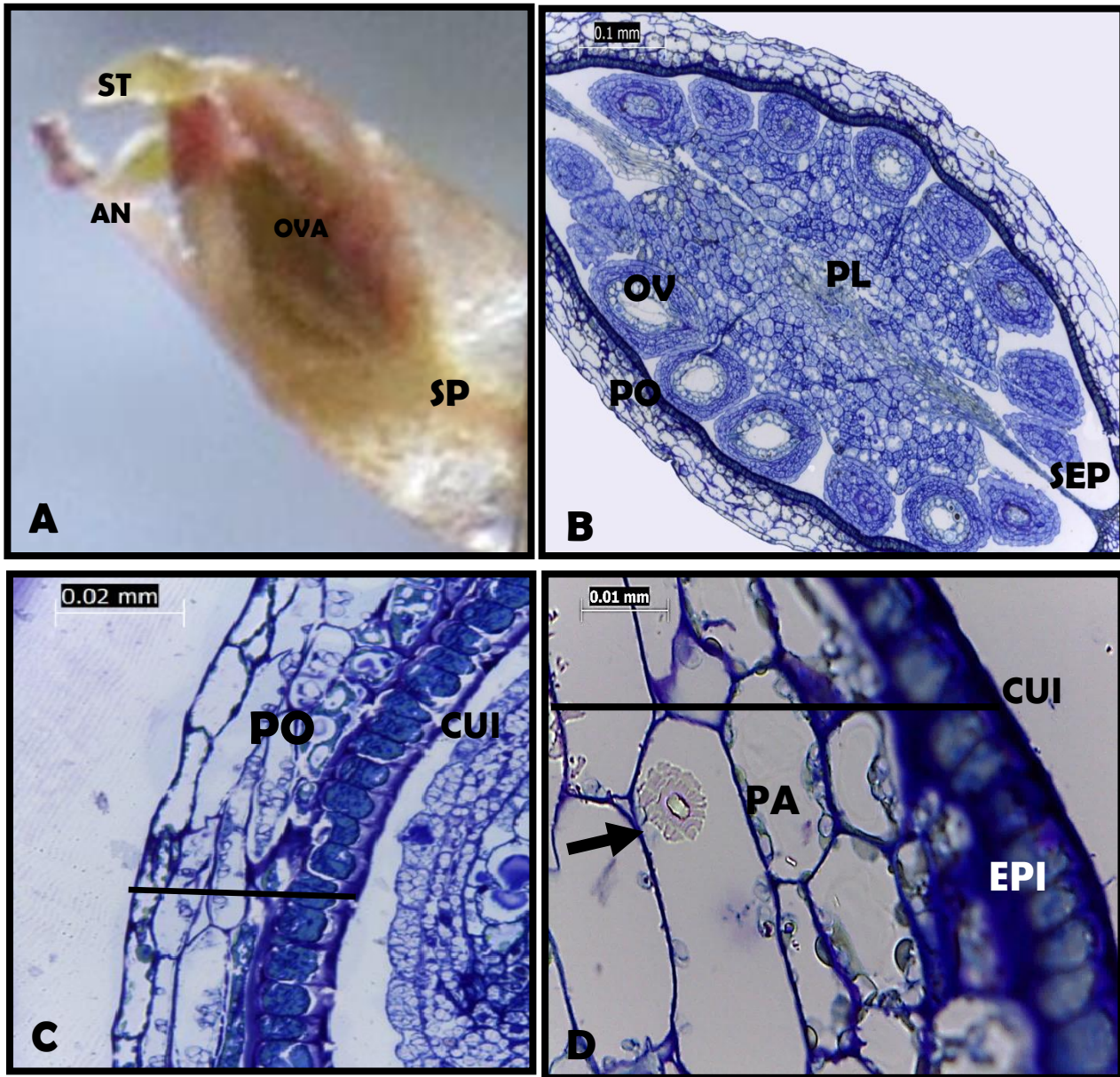
Las células del tegumento interno localizadas en el extremo calazal presentan un núcleo y nucléolo conspicuo localizado centralmente, las células adyacentes a las células nucelares poseen vacuolas y un núcleo y nucléolo conspicuo, localizado en la periferia. Las células localizadas en la zona micropilar presentan un núcleo desplazado a la periferia por la gran cantidad de inclusiones, que prácticamente ocupan todo el citoplasma (Figura 18).

## **Nucela**

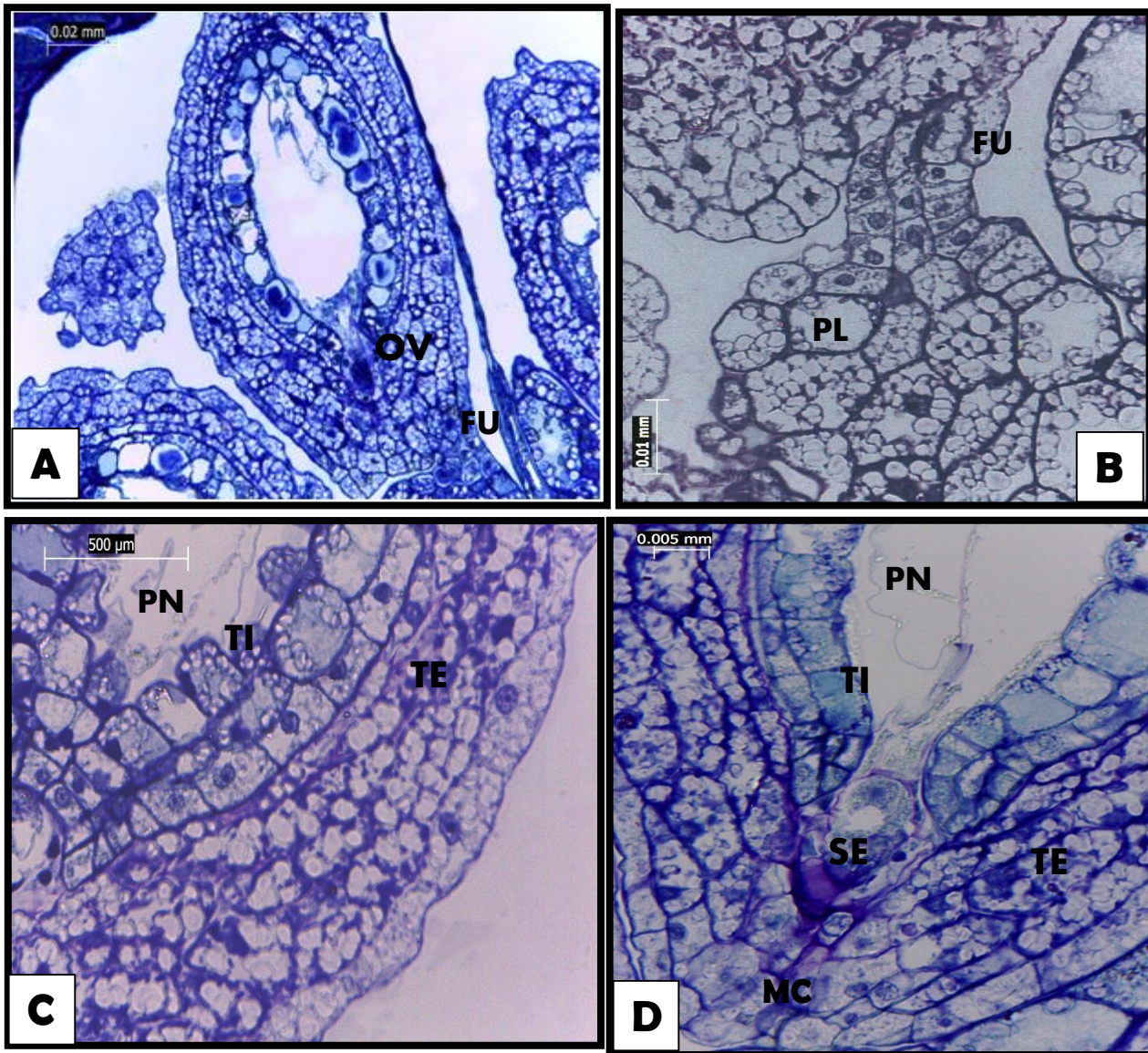
La nucela está prácticamente degradada, se pueden observar algunas células en proceso de lisis. El plasmodio nucelar en flores en antesis se encuentra completamente desarrollado (Figura 19).

## **SACO EMBRIONARIO**

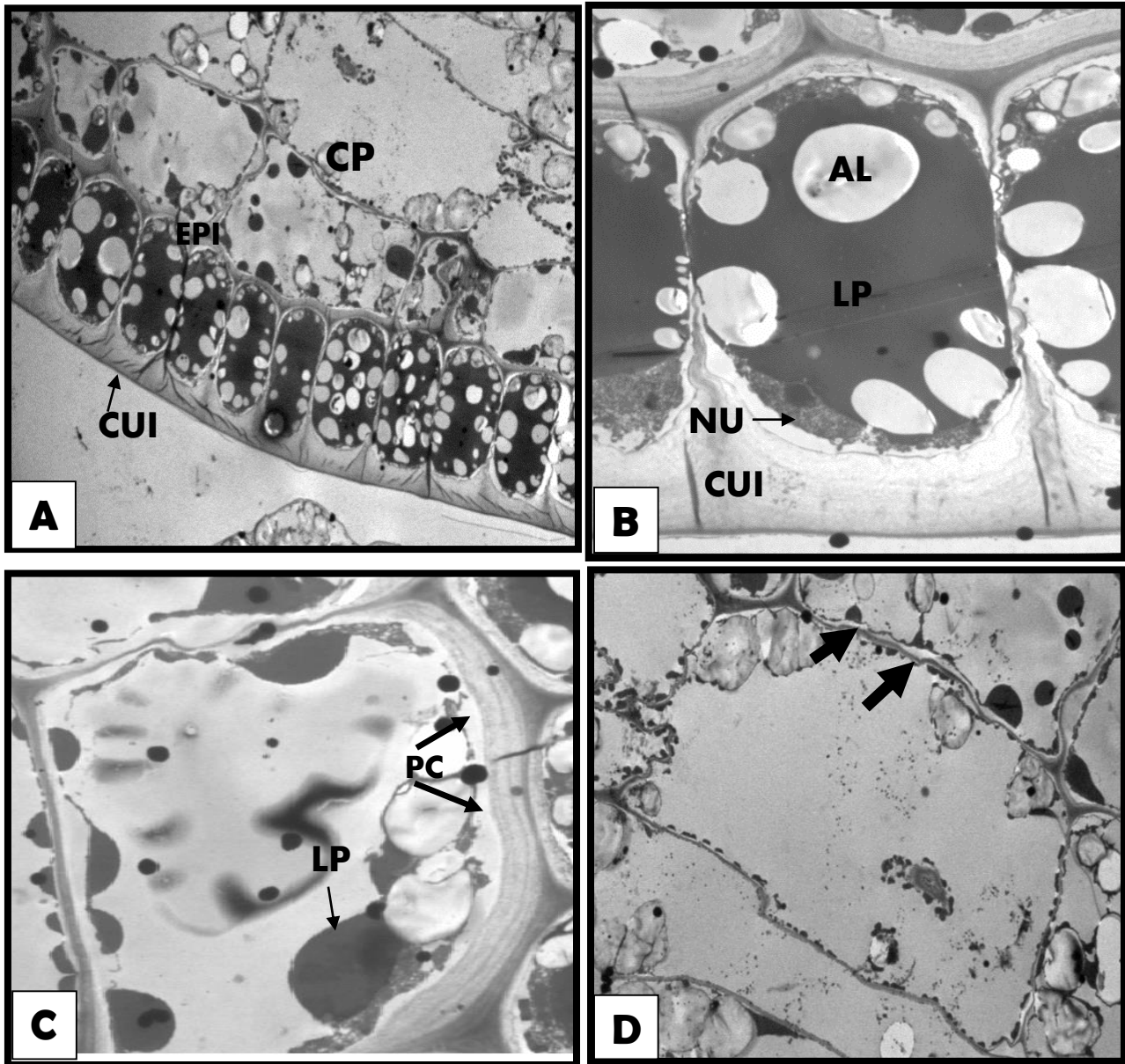
El saco embrionario es tetracelular, compuesto de dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central. Las sinérgidas se localizan hacia el micrópilo, poseen un citoplasma denso. La célula central uninucleada se localiza hacia la zona calazal y presenta un citoplasma denso, con grandes cúmulos de cromatina. La ovocélula se observa muy pequeña y probablemente en degeneración (Figura 20).



**Figura 14.** Ovario de *Noveloa coulteriana* **A)** Botón floral emergiendo de la espata. **B)** Corte longitudinal de ovario **C)** Pared del ovario **D)** Epidermis interna con células parenquimáticas adyacentes, flecha Indica incrustaciones de oxalato de calcio. **AN:** Antera, **CUI:** Cutícula interna, **EPI:** Epidermis interna, **OVA:** Ovario, **PA:** Parénquima, **PO:** Pared del ovario, **SEP:** Septo, **SP:** Espatela, **ST:** Estigma.



**Figura 15.** Óvulo de *Noveloa coulteriana*. Corte longitudinal de óvulo. **B)** Acercamiento funículo **C)** Tegumento interno y tegumento externo. **D)** Zona en donde convergen tegumento externo y tegumento interno. **FU:** Funículo, **MC:** Micrópilo **OV:** Óvulo, **PN:** Plasmodio Nucelar, **PL:** Placenta, **SE:** Saco embrionario.



**Figura 16. Pared del ovario.** A) Epidermis interna B) Células epidermis interna con vacuolas, lípidos, núcleo y nucléolo C) Células parenquimáticas adyacentes a epidermis interna D) Células parenquimáticas localizadas entre epidermis interna y epidermis externa felchas señalan pared celular. AL: Almidón, CP: Células parenquimáticas, CUI: Cutícula interna, EPI: Epidermis interna, LP: Lípidos, NU: Núcleo, PC: Pared Celular

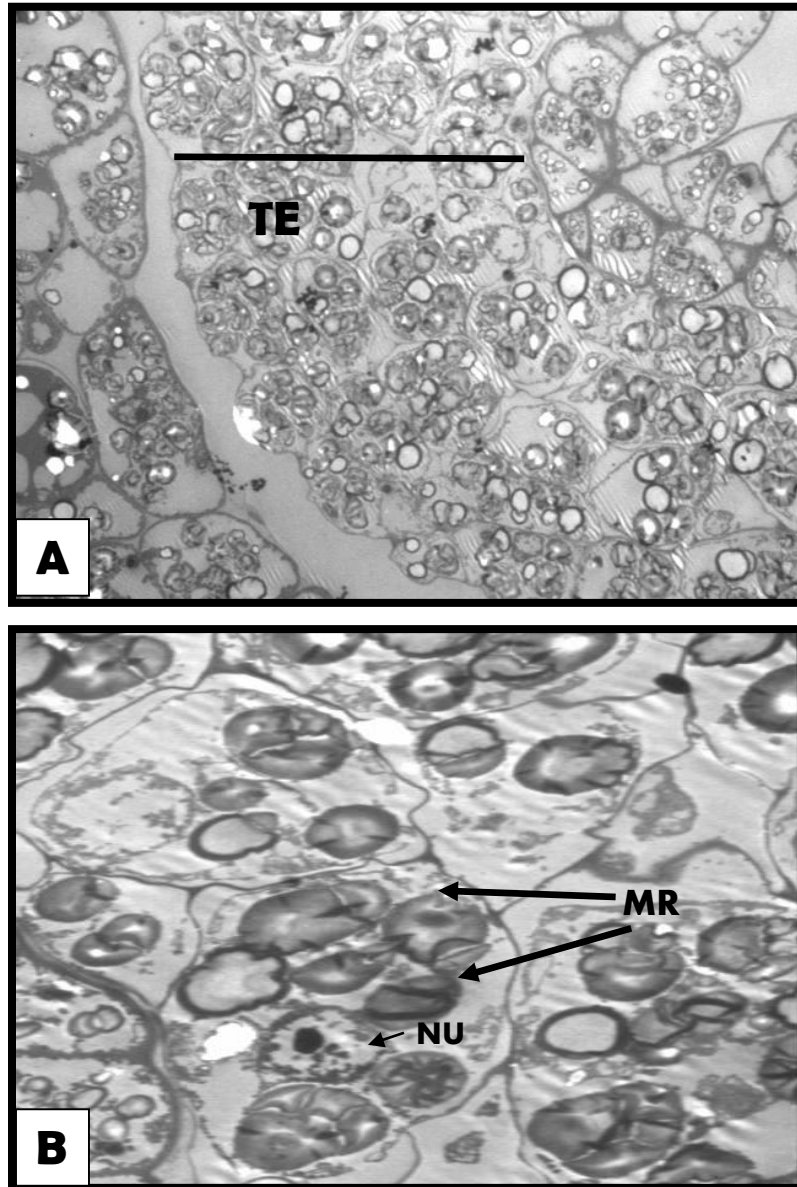
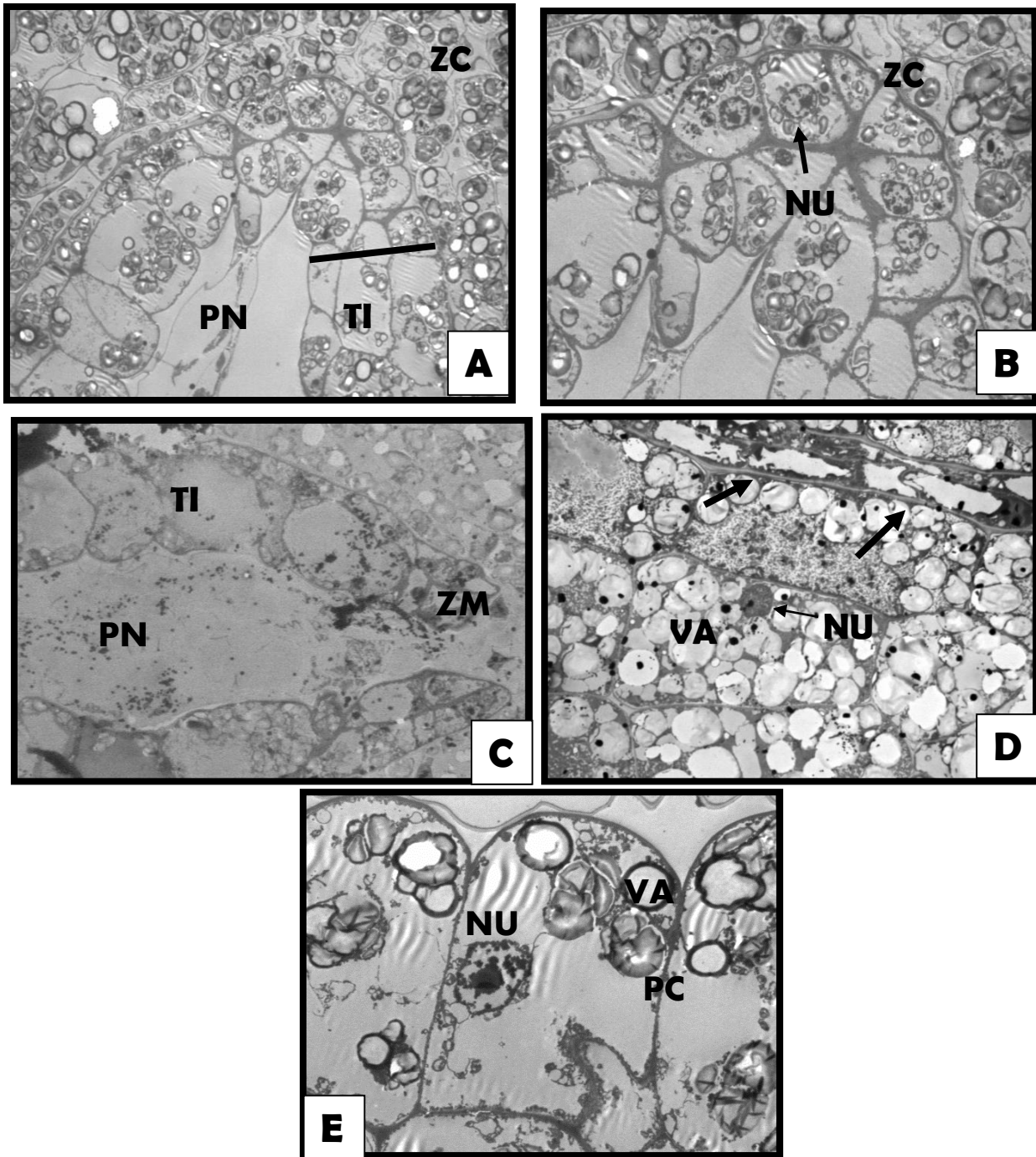
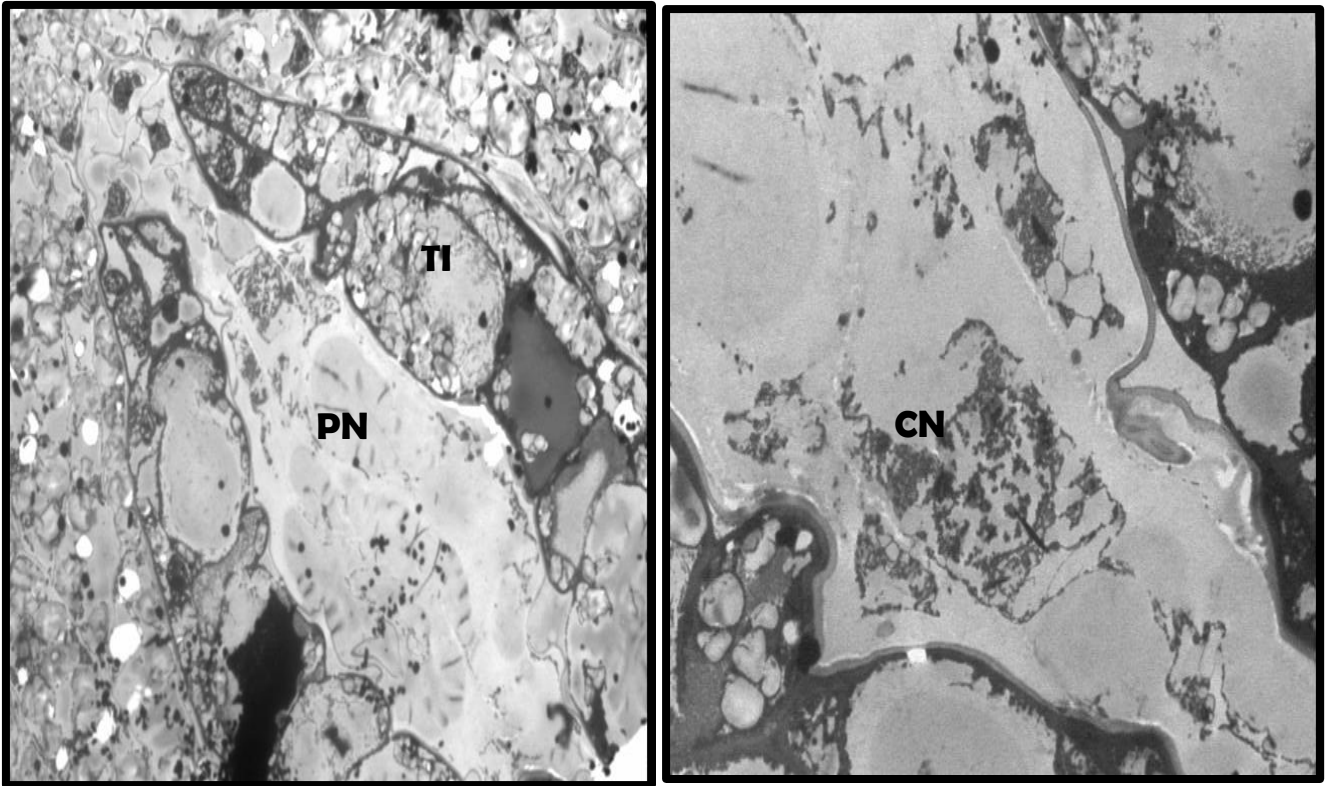


Figura 17. Tegumento externo (MET). A) Estratos celulares que forman el tegumento externo. B) Células del tegumento externo, flechas indican material de resera. MR: Material de reserva, NU: Núcleo.

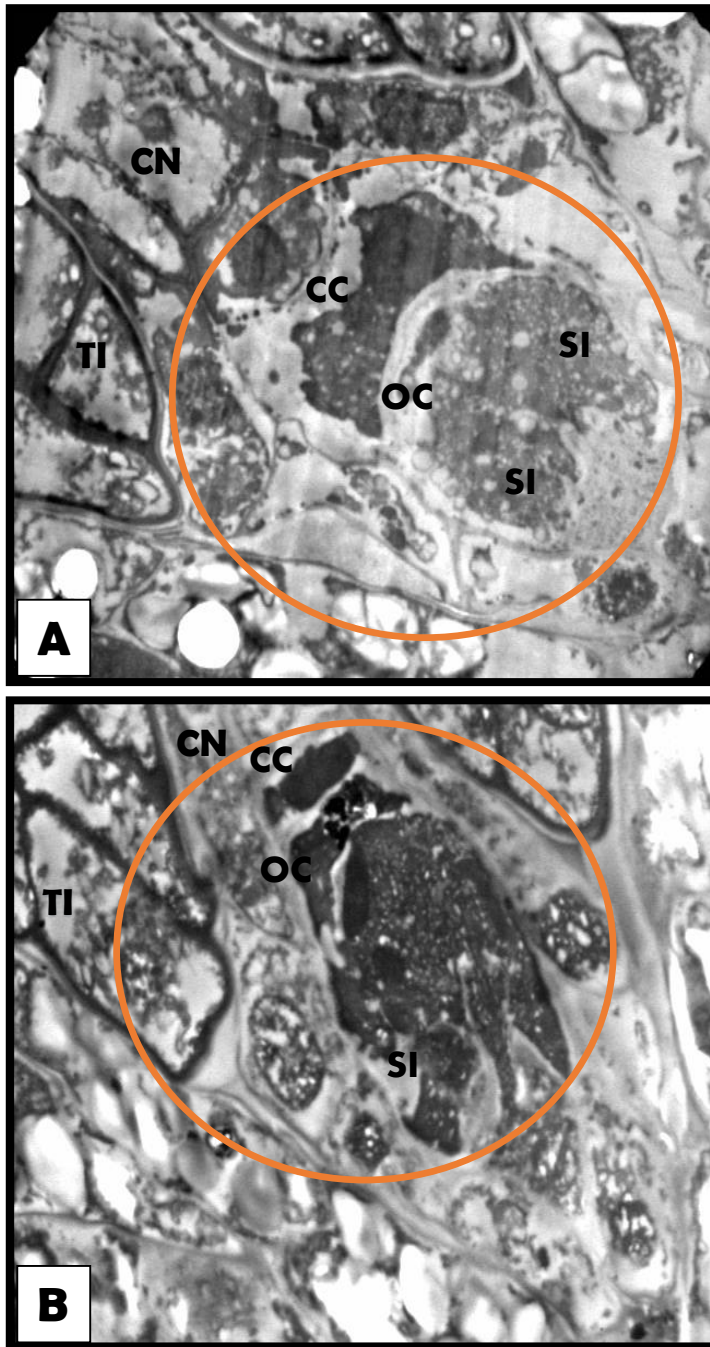




**Figura 18.** Tegumento interno **A)** Estratos que forman el tegumento interno **B)** Células tegumento interno zona calazal **C)** Tegumento interno zona micropilar **D)** Acercamiento células tegumento interno zona micropilar, flechas indican pared celular. **E)** Células tegumento interno adyacentes a células nucleares. **NU:** Núcleo, **PC:** Pared celular, **PN:** Plasmodio Nuclear, **TI:** Tegumento interno, **VA:** Vacuolas **ZC:** Zona calazal, **ZM:** Zona micropilar.



**Figura 19.** Plasmodio Nucelar con algunos remanentes de células nucleares en lisis. **CN:** Células nucleares en lisis, **PN:** Plasmodio Nucelar.



**Figura 20. Saco embrionario.** A y B) Saco embrionario tetracelular se pueden apreciar algunas células nucleares en degradación. **CC:** Célula central, **CN:** Células nucleares, **TI:** Tegumento interno, **SI:** Sinérgidas, **OC:** Ovocélula.

## VII. DISCUSIÓN

El fruto maduro deshidratado de *Noveloa coulteriana* contiene entre 30 y 35 semillas (Philbrick, 1997), mismo dato que se confirmó en este trabajo, donde se obtuvo un promedio de 30 semillas por cápsula. Esto es notable en comparación con otros frutos de la subfamilia Podostemoideae, los cuales contienen entre 700 y 900 semillas como se observa en *Marathrum rubrum* (Philbrick, 1997).

Se pensaría que la producción baja de semillas esta correlacionada con el tamaño de los frutos, pues *M. rubrum* presenta un fruto maduro en promedio de 4.5 a 5 mm de largo y de 1.7 a 2.2 mm de diámetro, mientras *N. coulteriana* posee un fruto 1.6 a 2.8 mm de largo y 0.8 a 1.2 mm de diámetro (Cook, 1996; Philbrick, 1997).

Realizando una proporción entre los tamaños promedios de los frutos y la producción de semillas en ambas especies, se obtuvo una relación 5/2 lo cual indica que el tamaño del fruto no está directamente relacionado con el número de semillas por fruto.

Observaciones en campo indican que mientras las especies de *Marathrum* pueden crecer en las rocas, solas o acompañadas con otras podostemáceas, *N. coulteriana* nunca se ha observado creciendo como especie única sobre la roca, siempre ocupa los lugares inferiores en la misma. Hasta el momento no hay una hipótesis satisfactoria para explicar esta distribución de *Noveloa*, pero su posición sobre la roca puede explicarse por una necesidad de incidencia luminosa menor que las podostemáceas que crecen en la parte superior y que por cierto son de mayor tamaño, como *M. rubrum* y *M. schiedeanum*. La presencia de plantas de *N. coulteriana* con dos colores distintos en el mismo río o en diferentes ríos se debe a la predominancia de antocianinas sobre los pigmentos clorofílicos y probablemente esté relacionado también con la incidencia lumínica.

En *N. coulteriana* tanto la pared del fruto como la placenta y los tegumentos del óvulo, contienen abundantes reservas, mismas que se presentan en la antesis y que van incrementando conforme maduran el fruto y las semillas, hasta llegar a un máximo (fruto de color verde) posteriormente empieza a decrecer conforme se presenta la deshidratación del fruto y llega a su mínima concentración durante la dispersión de las semillas (Comunicación personal de Claudia Espinosa). Esta investigación se realizó solo en la etapa de flores en antesis y ya se observan abundantes reservas en el pericarpio y los óvulos, mismas que deben sostener la maduración de los óvulos para su transformación en semillas.

En esta familia se han reportado tres tipos de gineceo. Para la subfamilia Wedellinoideae (Jäger-Zürn, 1997) el gineceo está formado por un ovario bicarpelar y un septo incompleto. Para la subfamilia Podostemoideae se reporta un ovario bicarpelar sincárpico, con un septo delgado (Razi, 1949; Chaudhary *et al.*, 2014) y en la familia Tristichoideae el ovario es tricarpelar y trilocular sincárpico (Murguía-Sánchez, 2003; Seghal *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos corroboran que *N. coulteriana* presenta un gineceo con un ovario bicarpelar sincárpico y un septo delgado.

Los estudios estructurales del ovario son muy escasos para las especies de la familia Podostemaceae, para *N. coulteriana* se describe que el ovario contiene una gran cantidad de almidón y que las células de la epidermis interna del ovario son binucleadas y semejantes a un tapete tegumentario (Kapil, 1970). En *Lawia ceylanica* las células de la epidermis interna son de mayor tamaño que las células que forman la epidermis externa, y las capas de parénquima que siguen son de gran tamaño y con grandes reservas de almidón (Razi, 1949).

Para *N. coulteriana* el ovario contiene grandes cantidades de almidón y se trata de células uninucleadas lo cual nos puede sugerir que probablemente la descripción de la epidermis interna del ovario semejante a un tapete tegumentario se trate de un error de apreciación.

Sin embargo, en estudios preliminares con microscopía de campo oscuro y de polarización, parece ser que las reservas son en su mayoría polisacáridos insolubles pero el almidón es escaso (Datos no presentados).

La ultraestructura de la epidermis interna de la pared del ovario de *N. coulteriana* sugiere que la función de este estrato celular es evitar la entrada de agua a los óvulos en crecimiento y posterior desarrollo de las semillas (Esau, 2008, Azcárraga, 2010). La fase gametofítica se inicia cuando la planta se encuentra sumergida y esta fase se lleva a cabo en el interior del tallo aplanado con las estructuras reproductoras envueltas en una espátela, lo cual implica que existe un aislamiento con respecto al ambiente acuático que lo rodea. No es sino hasta el momento que el botón floral emerge y sale del agua que se presenta la ruptura de la espátela (Cook, 1996; Jäger-Zurn y Grubert, 2000).

Las células del tegumento externo de los óvulos de *N. coulteriana* son células uninucleadas, en las cuales se acumula gran cantidad de lípidos y almidón, producto de la translocación de fotosintatos de la planta madre a los óvulos. Estas reservas servirán para sustentar el embrión durante la maduración de la semilla, puesto que, el pedicelo que crece y eleva al gineceo y que lo conecta con la planta madre

reduce su diámetro, se torna café y probablemente se oblitere y corte el paso de sustancias hacia el fruto y las semillas en maduración.

Las células del tegumento interno son células uninucleadas que difieren en morfología y estructura respecto a las células del tegumento externo. La presencia de vacuolas en dichas células es muy evidente, se sabe que en general las vacuolas que se presentan en el citoplasma de las plantas, puede contener, además de agua y pH frecuentemente ácido, antocianinas y flavonas responsables del color de flores y frutos, cristales de oxalato de calcio (drusas y rafidios) como productos de metabolismo o reservorios de calcio (Azcárraga, 2010).

En la mayoría de las angiospermas, la nucela permanece en el interior del espacio delimitado por el tegumento interno y en este mismo espacio tiene lugar la megasporogénesis y la megagametogénesis (McCauley *et al.*, 2013). En Podostemaceae, esta estructura se transforma en un plasmodio nucelar. En *N. coulteriana* el plasmodio nucelar inicia su formación antes de la fecundación y en la etapa de flores en anthesis se encuentra completamente desarrollado.

La doble fecundación es considerada un fenómeno universal y definitivamente una característica ancestral de las angiospermas, que las define como grupo monofilético. Esto involucra la fusión de un gameto masculino con la ovocélula, para formar un cigoto diploide que posteriormente formará el embrión y la fusión del otro gameto masculino con los núcleos polares de la célula central, para formar un endospermo triploide (Faure, 2000; Williams y Friedman, 2004).

El 70% de las angiospermas estudiadas presenta un desarrollo de saco embrionario de tipo Polygonum que consiste de siete células y ocho núcleos: dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central con dos núcleos polares y tres antípodas (Raghavan, 2003). En las Podostemaceae, en general y en particular en *N. coulteriana* el saco embrionario o gametofito femenino posee solo cuatro células y se localiza por debajo del ápice del tegumento interno, entre éste y el tegumento externo que forma el micrópilo.

### **Ausencia de la doble fecundación**

Una característica importante dentro de las podostemáceas, asociada a la ausencia de la doble fecundación, es el tiempo de degeneración de la célula central.

Para la subfamilia Tristichioideae esta célula degenera antes de la fecundación (Sikolia, 2008, 2009; Seghal *et al.*, 2010). Para la subfamilia Podostemoideae la célula central persiste hasta la etapa de la fecundación (Razi, 1949; Nagendran *et al.*, 1977; Jäger-Zürn., 1997).

Chaudhary *et al.*, (2014), demuestra que en *Zeylanidium lichenoides* (Tristichioideae) solo ocurre una sola fecundación, debido a que la célula central degenera antes de la llegada de los tubos polínicos.

Jiménez-Durán *et al.*, (2010), sugirió que la célula central de *Marathrum schiedeanum* (Podostemoideae) sufre muerte celular programada del tipo autofágico debido a la presencia de un núcleo picnótico, lo cual sugiere la falta de la doble fecundación.

La existencia de una sola fecundación en las angiospermas ha sido documentada en las especies de *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) y algunos híbridos del maíz. En *S. sinensis* se debe a una anomalía en la microgametogénesis, en donde solo un gameto masculino se forma, debido a la falla de la célula generatriz (Chaudhary *et al.*, 2014).

En *N. coulteriana* se observa un saco embrionario con cuatro células, que corresponden a dos sinérgidas, una ovocélula y una célula central. La ultraestructura del saco embrionario no permite distinguir si la célula central está o no en degeneración. Es necesario realizar cortes seriados del saco embrionario para determinar, sin lugar a dudas, si en esa etapa la célula central está en degeneración. Además sería recomendable utilizar otras metodologías, como la detección de muerte celular programada, para poder afirmar dicho fenómeno.

La estructura del óvulo de *N. coulteriana* sigue los patrones reportados para la subfamilia Podostemoideae en particular y la familia Podostemaceae en general.

## VIII. CONCLUSIONES

La descripción ultraestructural del óvulo de *Noveloa coulteriana* es uno de los primeros aportes, con este método, que se realiza para las Podostemáceas americanas y el primero para *Noveloa*.

*Noveloa coulteriana* presenta un ovario bicarpelar, con óvulos anátropos, bitégmicos, exóstomos, y casi sésiles.

La epidermis interna del ovario, en flores en antesis, presenta células con una gran cantidad de lípidos y una cutícula sumamente gruesa, que aísla a las semillas durante su desarrollo.

El número de estratos celulares de los tegumentos varía de acuerdo con la posición que ocupan en el óvulo.

Las células del tegumento externo presentan mayor cantidad de reservas en su interior, en comparación con las células que constituyen al tegumento interno, en flores en antesis.

Existe abundante material de reserva que se almacena en la placenta, en los tegumentos de los óvulos y en el pericarpio, en las flores en antesis.

En las flores en antesis, el saco embrionario es tetracelular, formado por dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central, que aparentemente se encuentra en degeneración.



## IX. Literatura consultada

Ameka K.G., E. Pferfer y R. Rutishauser. 2002. Developmental morphology of *Saxicola amicorum* y *S. submerse* (Podostemaceae: Podostemoideae) from Ghana. Botanical Journal of Linnean Society **139**: 255-273.

Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2013. Página en red: [www.mobot.org](http://www.mobot.org). Consultada 10 marzo 2015.

Arekal G.D. y C.R. Nagendran. 1977. The female gametophyte in two Indian genera of *Tristichoideae* (Podostemaceae) - A reinvestigation. Proceedings of the Indian National Science Academic-Section B. **86**: 287-294.

Azcárraga R.M., M.P. Jácquez R., A.C. Bonfil, E.Z. Sandoval. 2010. Atlas de Anatomía Vegetal. Universidad Nacional Autónoma de México.

Baroux C., C. Spillane y U. Grossniklaus. 2002. Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. Genome Biology **3(9)**: 1-5.

Bravo C. 2011. Desarrollo del gametofito masculino y formación del tubo polínico en *Marathrum schiedeanum*, Podostemaceae. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México., D.F. 72 pp.

Chaudhary A., P. Khanduri , R. Tandon , P.L. Uniyal y H.Y. Mohan Ram. 2014. Central cell degeneration leads to three-celled female gametophyte in *Zeylanidium lichenoides* Engl. (Podostemaceae). South African Journal of Botany **91**: 99-106.

Cook C. D. K. 1996. Aquatic plant book. 2a. ed. Amsterdam, Nueva York: SPB Academic Publishing. 228 pp.

Cook C.D. K. y R. Rutishauser. 2007. Podostemaceae L. Richard ex C. Agardh, Aphor. Bot.: **125** (1822), nom. cons.

Esau K. 2008. Anatomía vegetal, meristemas, célula y tejidos de las plantas: su estructura, función y desarrollo. 3ªed Ediciones Omega. Barcelona. 776 pp.

Faure Jean-Emmanuel. 2000. Double fertilization in flowering plants: Discovery, study methods and mechanisms. Life Sciences **324**: 559-567.

Friedman W. E, Williams J. H. 2004. Developmental evolution of the sexual process in ancient flowering plant lineages. Plant Cell **16**: 119-113.

Haig D. 1990. New Perspectives on the Angiosperm Female Gametophyte. The Botanical Review. **56**: 236-274.

Jäger-Zürn I. 1997. Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichoideae). Aquatic Botany **57**: 151-182.

Jäger-Zürn I. y M. Grubert. 2000. Podostemaceae depend on sticky biofilms with respect to attachment to rocks in waterfalls. International Journal of Plants Sciences **161(4)**: 599-607.

Jiménez-Durán Karina, Bravo-Bello J. C., Márquez-Guzmán J. 2010. Programmed cellular death controls the formation of the endosperm in *Marathrum schiedeanum* (Podostemaceae). XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction. Bristol, Inglaterra.

Johri J. 1984. Embryology of angiosperms. Springer Verlag. Amsterdam, New York. 529-530p.

Katayama N., M. Kato, T. Nishiuchi y T. Yamada. 2011. Comparative anatomy of embryogenesis in three species of Podostemaceae and evolution of the loss of embryonic shoot and root meristems. *Evolution & Development* **13**: 33-342.

Kapil, R. N. 1970. Podostemaceae. *Bulletin of the Indian National Science Akademy* **41**: 104-109.

Khosla Ch. y A. Seghal. 2009. Pollination biology of *Indostricha ramosissima* (Podostemaceae: Tristichoideae). *Aquatic Botany*. **91**: 51-56.

Kita Y. y M. Kato. 2001. Intrafamilial phylogeny of the aquatic angiosperm Podostemaceae inferred from the nucleotide sequences of matK Gene. *Plant biology* **3**: 156-163.

Koi S. y Kato. M. 2007. Developmental morphology of the shoot in *Weddellina squamulosa* and Implications for shoot evolution in the Podostemaceae. *Annals of Botany* **99**: 1121–1130.

López-Curto, L., Márquez-Guzmán J., y Murguía-Sánchez G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. Libro de laboratorio. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 179 pp.

Luna R. R. 2006. Polinización cruzada entre dos especies del género *Marathrum* (Podostemaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 44pp.

Luna R. R. 2010. Barreras reproductivas entre dos especies del género *Marathrum* (Podostemaceae). Tesis de Maestría (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 119pp.

Lux A. 1994. Manual de microscopía electrónica, ultraestructura y citología vegetal. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas división de Estudios de Posgrado 70 pp.

Maheshwari P. 1948. The Angiosperm embryo sac. *The Botanical Review*. 14(1): 1:56.

McCauley R., Jiménez Durán Karina y Judith Márquez Guzmán. 2013. Procesos reproductivos. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco, S. Vázquez. (Eds). *Biología de Angiospermas*. Las prensas de ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 602 pp.

Mukkada A. J. 1969. Some Aspects of the Morphology, Embryology and Biology of *Terniola zeylanica* (Gardner) Tulasne. *New Phytologist* **68(4)**:1145-1158

Murguía-Sánchez G., Novelo A. R., Philbrick C. T. Y Márquez-Guzmán J. 2001. Desarrollo de los verticilos sexuales de *Vanroyanella plumosa* (Podostemaceae). *Acta Botánica Mexicana* **57**: 37-50.

Murguía-Sánchez, G., A.R. Novelo., C. T. Philbrick y J. Márquez-Guzmán. 2002. Embryo sac development in *Vanroyanella plumosa* Novelo & Philbrick (*Podostemaceae*). *Acta Botánica Mexicana* **57**:37-50.

Murguía-Sánchez G. 2003. Embriología comparada de los géneros de la familia Podostemaceae en México. Tesis de Doctorado (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. D. F. 125 pp.

Nagendran C.R., G.D. Bangalore, M. Arekal y K. Bangalore. 1977. Embryo sac studies in three Indian species of *Polypleurum* (Podostemaceae). *Plant Systematics and Evolution* **128**: 215-226.

Nagendran C.R.,V.V. Anand, G. D. Arekal. 1977. The embryo sac of *Podostemum subulatus* (Podostemaceae). *Plant Systematics and Evolution* **134**:121-125.

Novelo R.A. y C.T. Philbrick. 1995. A new species of *Oserya* (Podostemaceae) from Jalisco México. *Novon* **5**: 54-56.

Novelo R.A. y C.T. Philbrick. 1997. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. *Aquatic Botany* **57**: 275-303.

Novelo A., y C.T. Philbrick. 2000. Familia Podostemaceae en: Flora del Bajío y de regiones adyacentes, fascículo 87. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. México, en colaboración con CONACYT y CONABIO pp8.

Philbrick C.T., y A. Novelo. 1993. River weeds: a fascinating family of aquatic flowering plants. *Aquaphyte* **13**: 6-7

Philbrick C. T., y A. Novelo. 1994. Seed germination of Mexican Podostemaceae. *Aquatic Botany* **48**: 145-151

Philbrick C.T. y A. Novelo. 1995. New world Podostemaceae: Ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia* **47**: 210: 222

Philbrick, C.T., Novelo, R.A., 1997. Ovule number seed number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquatic Botany* **57**: 183–200

Philbrick C.T., A. Novelo. 1998. Flowering phenology, pollen flow and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* **62**:199-206

Philbrick C.T, Milada. V. y A. Novelo R. 2006. Preanthesis cleistogamy in the genus *Podostemum* (Podostemaceae). *Rhodora* **108**: 195-2.

Quiroz F.A., A. Novelo y C.T. Philbrick. 1997. Water chemistry and the distribution of Mexican Podostemaceae: a preliminary evaluation. *Aquatic Botany* **57**: 201-212.

Raghavan V. 1997. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press. 690 pp.

Raghavan V. 2003. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytology*. **159**: 565-583.

Razi. B. 1949. Embryological studies of two members of the Podostemaceae. *Botanical Gazette* **111**: 211–218.

Reyes-Ortega I., M.E. Sánchez-Coronado., A. Orozco-Segovia. 2009. Seed germination in *Marathrum schiedeanum* and *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* **90**:13-17.

Rutishauser R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river weeds). *Aquatic Botany* **57**: 29-70.

Rutishauser R., A. Novelo y C.T. Philbrick 1999. Developmental morphology of New World Podostemaceae: *Marathrum* and *Vanroyenella*. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 29-45.

Sikoloia S. y P. Ochora. 2008. Female gametophyte in Tristichoideae (Podostemaceae): re-investigation. *Journal of Biological Sciences* **8**: 1158–1165.

Sikoloia S. y J.C. Onyango 2009. Female Gametophyte in two Kenyan species of *Inversodicraea* (Podostemaceae). *Research Journal Botany* **4**: 29-39.

Sehgal A., J.P. Khurana., M. Sethi., H. Ara, M. Jain. 2007. Organ identity of the thalloid plant body of *Griffithella hookeriana* and *Polypleurum stylosum* – Podostemoideae (Podostemaceae). *Plant Systematics and Evolution* **267**: 93-104.

Sehgal A., J. P. Khuruna., M. Sethi., H. Ara. 2010. Occurrence of unique three-celled megagametophyte and single fertilization in an aquatic angiosperm-*Dalzellia zeylanica* (Podostemaceae-Tristichoideae). *Sexual Plant Reproduction* **24**: 199-210.

Soltis D.E., M. E. Mort., P.S. Soltis., C. Hibsich-Jetter., E.A. Zimmer y D. Morgan. 1999. Phylogenetic relationships of enigmatic angiosperm family Podostemaceae inferred from 18 rDNA and rbcL sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **11**: 261-272.

Tippery N. P., C.T. Philbrick, C. P. Bove y D.H. Les. 2011. Systematics and Phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany* **36(1)**: 105-118

Vázquez N. G., Echeverría O. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. p. 168.

Van Royen P. 1951. The Podostemaceae of the New World. Part I. *Mededeelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van der Rijks Universiteit te Utrecht* 107: 1-151. En: Tippery N. P., C.T. Philbrick, C. P. Bove y D.H. Les. 2011. Systematics and Phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany* **36(1)**: 105-118

Villanueva A.U.R. 2013. Desarrollo de la antera y grano de polen en *Noveloa coulteriana* (Podostemaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. D.F. 66 pp.

Willis K. J. J. C. Mc Elwain. 2002. The evolution of plants. Oxford University Press. P. 156-193.