



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA DE LOS MERISTEMOS DE
MARATHRUM RUBRUM (PODOSTEMACEAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

VERA ISABEL MARTÍNEZ BARRADAS



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ
GUZMÁN

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

1. Martínez
Barradas
Vera Isabel
55 93 25 09
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308647226

2. Doctora en Ciencias
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

3. Doctor en Ciencias
Antonio
Lot
Helgueras

4. Doctora en Ciencias
Margarita
Collazo
Ortega

5. Maestro en Ciencias
José Gonzalo Ricardo
Wong

6. Maestra en Ciencias
Mónica Karina
Pérez
Pacheco

7. Estructura de los meristemas de *Marathrum rubrum* (Podostemaceae).
51p
2015

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biología del Desarrollo en Plantas, en el Taller de “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, IN213015, Estudios reproductivos en clados Neotropicales de la familia Podostemaceae. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

A mis padres.

Agradecimientos

A la Dra. Judith Márquez por haberme motivado en todo momento, por su paciencia, por todas las enseñanzas, y por ser un ejemplo a seguir.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez por la ayuda en campo y laboratorio, por guiarme en todo momento desde que comencé este trabajo.

Al M. en C. Ricardo Wong por la ayuda en campo y laboratorio, por su apoyo y disposición en todo momento.

A la Dra. Margarita Collazo por todas las correcciones y consejos.

A la Dra. Sonia Vázquez por su ayuda y amabilidad en todo momento.

A la M. en C. Laura Patricia Olguin por facilitar el uso de las cámaras de ambientes controlados.

A la Biol. Yolanda Hornelas por el apoyo brindado para la observación del material al microscopio electrónico de barrido.

A la M. en C. Ana Isabel Bieler por la toma de micrografías.

A la M. en C. Reyna Lara por el apoyo para la observación de material al microscopio electrónico de transmisión.

A la M. en I.B.B Rosalinda Tapia por el apoyo técnico para las salidas de campo.

Al jurado revisor: Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dr. Antonio Lot Helgueras, Dra. Margarita Collazo Ortega, M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong, M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco, por sus correcciones al presente trabajo.

A mis compañeros del taller y el laboratorio, por su apoyo, y hacer agradable el trabajo todos los días.

A todos los maestros que marcaron mi formación profesional, en especial a Marche, por su exigencia, a Sara Frías, por su excelente clase y ser no solo una profesora sino también una amiga, a Sinué, por su pasión al enseñar con lo cual alentó mi amor por las plantas.

A mis amigos de la licenciatura: Marina, Mariana, Rubi, Aban, Adriana, Antonieta, Sandra, Víctor, Diana, Andrés, Isaac, Casa, Enya, Valeria que hicieron de esta una etapa inolvidable.

A Jessica, Mafer, y Gabriel, por seguir aquí a pesar del tiempo.

A Ernesto por su apoyo en todo momento.

A Javier y a Erick por todas las tardes de café y consejos.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

A la UNAM

ÍNDICE

Resumen.....	9
Introducción.....	10
Antecedentes.....	11
Biología de Podostemaceae.....	11
Descripción botánica.....	12
Filogenia de Podostemaceae.....	14
Meristemos.....	15
Tipos de meristemos.....	16
Meristemo apical del tallo.....	17
Meristemo subapical de la raíz.....	18
Células meristemáticas.....	19
Expresión génica en el meristemo apical del tallo.....	20
Meristemos en Podostemaceae.....	21
Justificación.....	24
Hipótesis.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	25
Método.....	26
Material biológico.....	26
Germinación.....	27
Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	27
Procesamiento del material para su observación al microscopio de fotones.....	28
Análisis de la ultraestructura.....	28

Resultados.....	29
Germinación.....	29
Anatomía del embrión.....	32
Anatomía del polo apical.....	32
Anatomía del polo radicular.....	35
Ultraestructura del polo apical.....	35
Desarrollo posterior de las primeras hojas.....	38
Discusión.....	39
Conclusiones.....	45
Bibliografía.....	46
Anexo 1.....	50

RESUMEN

La familia Podostemaceae comparada con el resto de las angiospermas presenta variaciones en la estructura y localización de los meristemos apical del tallo y subapical de la raíz. En particular la subfamilia Podostemoideae, a la cual pertenece *Marathrum rubrum* se caracteriza por la pérdida del meristemo subapical de la raíz y una reducción del meristemo apical del tallo en el embrión. Las descripciones de estos caracteres en la familia se basan únicamente en el estudio de especies asiáticas. En este trabajo se aborda el estudio estructural y ultraestructural de los meristemos en el embrión de *Marathrum rubrum*, podostemácea americana perteneciente a la subfamilia Podostemoideae. Se encontró que *M. rubrum* carece por completo de meristemo subapical de la raíz, presentando el mismo patrón que las especies asiáticas, y el meristemo apical del tallo presenta una variante con respecto al descrito en las especies asiáticas estudiadas.

INTRODUCCIÓN

Las podostemáceas son plantas acuáticas con adaptaciones para la vida en la superficie de rocas localizadas en ríos de corrientes rápidas y cascadas, y estas novedades morfológicas requieren de cambios en el desarrollo (Katayama *et al.*, 2010). Respecto al desarrollo del tallo, la familia Podostemaceae presenta dos patrones distintos: en las subfamilias Tristichoideae y Wedellinoideae hay un crecimiento por medio de un meristemo apical del tallo con estructura túnica-carpus característica de las angiospermas, y la subfamilia Podostemoideae carece de meristemo apical del tallo con estructura túnica-carpus, donde además el crecimiento del tallo es determinado (Hammond, 1936; Suzuki *et al.*, 2002; Imaichi *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2010), es decir, al alcanzar la estructura formada su tamaño y forma predeterminada genéticamente, la división celular se detiene en el meristemo (Beck, 2010). En cuanto a la raíz, la pérdida del meristemo radicular en el embrión se presenta en las subfamilias Wedellinoideae y Podostemoideae, no así en Tristichoideae. La formación de raíces adventicias a partir del hipocótilo es un carácter distintivo de la subfamilia Podostemoideae (Rutishauser, 1997; Katayama *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2013).

La información anterior se desprende de estudios realizados exclusivamente en podostemáceas asiáticas. En el presente trabajo se estudió la estructura del embrión y la localización de la actividad meristemática en un miembro americano que pertenece a la subfamilia Podostemoideae.

ANTECEDENTES

Biología de Podostemaceae

Podostemaceae es una familia de angiospermas acuáticas estrictas que viven unidas a rocas en ríos de corrientes rápidas o cascadas en ambientes tropicales y subtropicales, donde los niveles de agua varían de acuerdo a la estación; durante la estación seca, cuando los niveles de agua disminuyen, las plantas florecen al estar expuestas al aire (Katayama *et al*, 2013). Dentro de la familia hay una gran variación en la morfología. Comúnmente presentan un cuerpo taloide con crecimiento dorsoventral, las hojas pueden llegar a medir hasta dos metros, e incluso consistir de una sola capa de células (Rutishauser, 1997). Se encuentran unidas al sustrato por pelos adhesivos los cuales, a su vez, se unen por medio de un *biofilm* de cianobacterias a las rocas por sustancias poliméricas extracelulares secretadas por las mismas (Jägern-Zurn y Grubert, 2000). Existe un gran polimorfismo dentro de la familia a varios niveles taxonómicos, e incluso a nivel de individuo. Sin embargo hay ciertos caracteres particulares de la familia, como la presencia de un pseudosaco embrionario que resulta de la desintegración de las células nucleares, además de no presentar endospermo (Rutishauser, 1997).

Marathrum es un género polifilético (Tippery *et al.*, 2011) del Nuevo Mundo y está compuesto por 25 especies. En México se han reportado siete especies de *Marathrum*: *M. elegans* P. Royen, *M. haenkeanum* Engler, *M. tenue* Liebmann, *M. trichophorum* P. Royen, *M. schiedeanum* (Chamisso) Tulasne y *M. rubrum* Novelo y Philbrick (Novelo y Philbrick, 1993; 1997), y la recientemente asignada a éste

grupo *M. plumosa* (Novelo y Philbrick) Philbrick y Bove (antes *Vanroyenella plumosa*) (Tippery et al., 2011). También se ha considerado que *M. rubrum* y *M. schiedeanum* se agrupan en una sola especie: *Marathrum foeniculaceum* Bonpl. (Novelo et al., 2009).

Descripción botánica, Novelo y Philbrick

Marathrum rubrum (fig. 1) es una hierba acuática con un tallo postrado largo y aplanado de aproximadamente 1 cm de diámetro que crece fuertemente adherido a rocas. **Hojas** alternas de hasta 20 cm de largo, peciolo de 2.5 a 9 cm de largo, cilíndrico, de hasta 0.8 mm de diámetro con una base ensanchada. Hojas repetidamente pinnadas de 2- 4.5 mm de largo y 0.02-0.06 mm de ancho, ápice agudo. **Flores** hermafoditas, actinomorfas, pediceladas, con crecimiento individual y axilar, protegidas por una espátula de 0.7-2 cm de largo, delgada y que se ensancha desde una base más estrecha. **Pedicelos** de 3- 5.5 cm de longitud, que se elongan durante la antesis, con un ápice expandido en forma de copa en la base de la cápsula, copa de 1.5-2 mm de diámetro, con bordes irregulares. **Tépalos** de 0.5-0.9 mm de longitud, triangulares, alternos a los estambres. **Estambres** entre 7 y 9, libres, en anillo rodeando el pistilo; filamentos 2.3-4(-9) mm de longitud, subulados, aplanados, se elongan durante la antesis, deciduos; anteras 1.5-2.8 mm de longitud, sagitales, basifijas, dos tecas, con dehiscencia longitudinal mediante dos suturas. **Ovario** súpero, elipsoide, con dos lóculos; estigmas 2, 0.6-1.5 mm, largos, libres, cónicos, óvulos numerosos, placentación axilar. **Fruto** 4.5-5 (-6) mm de longitud y 1.7-2.2 mm de diámetro, cápsula de dos lóculos, márgenes de la sutura engrosados; dos valvas,

subiguales, cada una con tres costillas, una de ellas decidua. **Semillas** de 0.25-0.30 mm de largo y 0.12-0.18 mm de ancho, obovoides (Novelo y Philbrick, 1993). El número promedio de semillas por cápsula puede ser desde 671 (Philbrick y Novelo, 1997) hasta un máximo de 924 (Philbrick y Novelo, 1998). **Polen** 14.5 μm de diámetro, tricolporado, tecta espinulosa (Novelo y Philbrick, 1993).

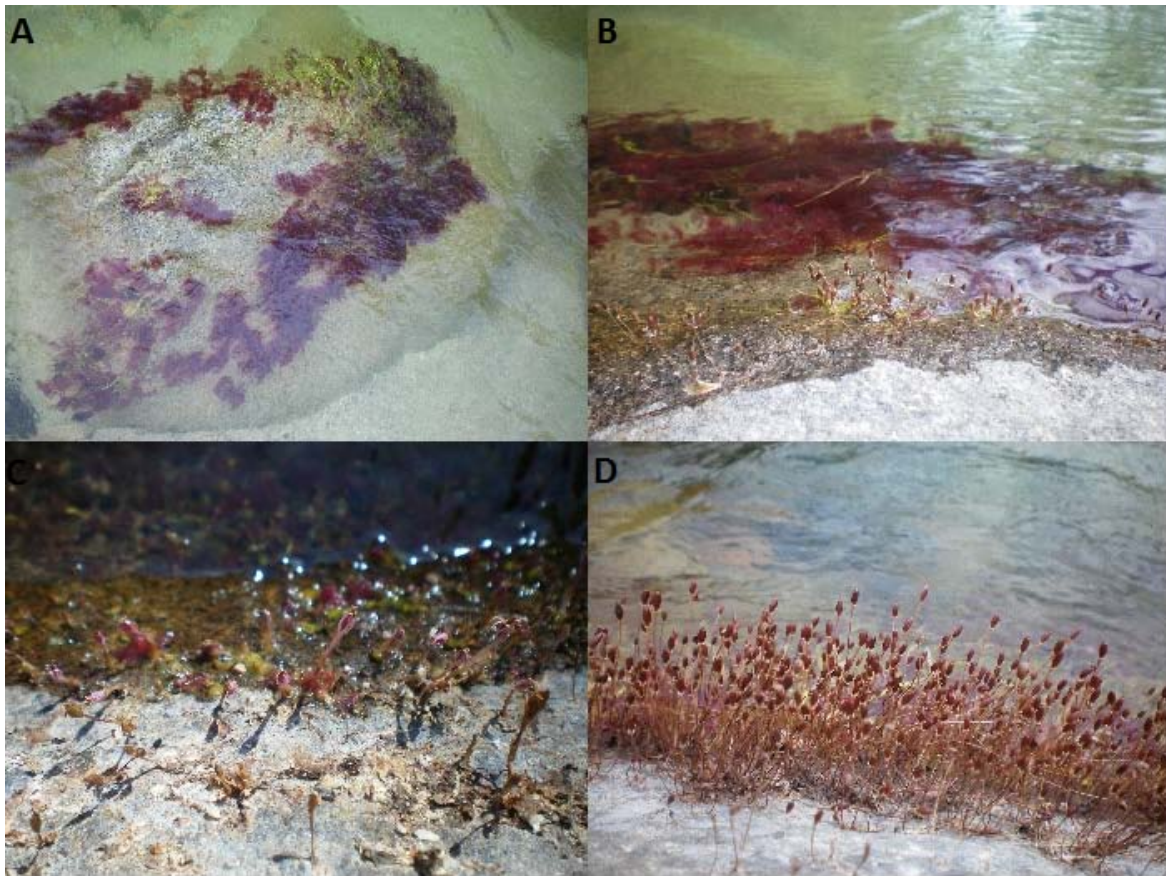


Figura 1. *Marathrum rubrum* A: cuerpo vegetativo sumergido. B: cuerpo vegetativo sumergido y frutos en la superficie de una roca. C: flores. D: frutos.

Filogenia de Podostemaceae

Las adaptaciones de las angiospermas acuáticas a su medio, consisten en la reducción y modificación de estructuras, lo cual puede oscurecer o eliminar caracteres de importancia taxonómica (Les *et al.*, 1997). Se han propuesto filogenias con base en la reducción y pérdida de estos caracteres (Kita y Kato, 2005; Koi y Kato, 2007; Katayama *et al.*, 2011). Para los fines de este trabajo se considerará la propuesta de Kita y Kato (2005) ilustrada en el árbol de Katayama *et al.* (2011) (fig. 2) basada en la presencia, reducción y ausencia de los meristemas apical del tallo y subapical de la raíz en el embrión, en la cual se propone a la familia Hypericaceae como el grupo hermano de la familia Podostemaceae, esta relación está también sustentada por otros autores (Savolainen *et al.*, 2000; Soltis *et al.*, 2000; Gustafsson *et al.*, 2002; Koi *et al.*, 2006). La subfamilia Podostemoideae se distingue por la formación de raíces adventicias a partir del hipocótilo, sin presentarse un meristemo radicular en el embrión. Dentro de la familia Podostemaceae los distintos géneros presentan diferencias en cuanto a la ausencia o presencia de estos meristemas, las cuales son usadas para proponer la filogenia de esta familia (Katayama *et al.*, 2011) (fig. 2).

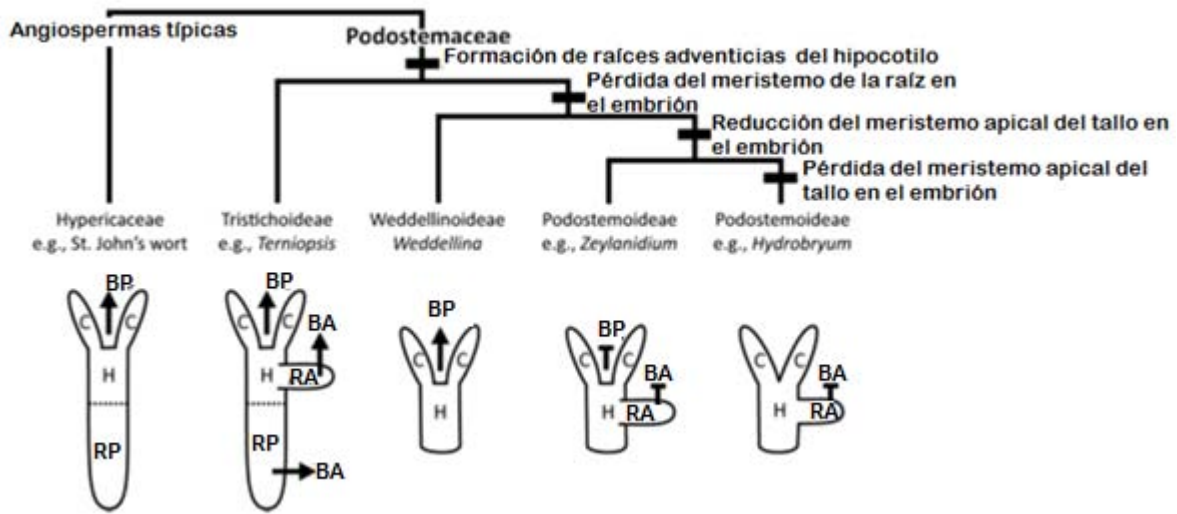


Figura 2. Hipótesis de cambios evolutivos en Podostemaceae (Katayama *et al.*, 2011, basado en: Kita y Kato, 2005) de acuerdo a la pérdida de los meristemos apical del tallo y subapical de la raíz. Se considera a la familia Hypericaceae como modelo de una angiosperma típica con raíz y brotes primarios. BP= brote primario, C= cotiledón, H= hipocótilo, RP= raíz primaria, RA= Raíz adventicia, BA= Brote adventicio. Las flechas indican brotes indeterminados con meristemos convencionales, y las líneas en forma de “T” indican brotes determinados en ausencia de un meristemo convencional.

Meristemos

Los meristemos pueden definirse como sitios localizados de continua división celular (Sussex y Kerk, 2002; Taiz y Zeiger, 2010), que añaden nuevas células a una planta, o parte de una planta mientras otras alcanzan la madurez y se diferencian (Esau, 1977; Beck, 2010).

La ventaja de estas estructuras en el plan corporal de las plantas es que las zonas meristemáticas donde las células se están formando, especializando y diferenciando, están separadas de las zonas funcionales de tejidos maduros, en las cuales se está llevando a cabo la fotosíntesis, el movimiento de moléculas orgánicas e inorgánicas y síntesis de componentes celulares y compuestos secundarios. Así, la planta puede tener un crecimiento continuo y mantenerse metabólicamente activa por completo (Sussex y Kerk, 2002).

Tipos de meristemos

Se distinguen diversos meristemos de acuerdo a su posición en la planta, entre ellos se encuentran a) el subapical de la raíz y apical del tallo, que contribuyen al crecimiento en longitud; b) meristemos intercalares, que son tejidos proliferativos rodeados por tejidos diferenciados, comúnmente en la base de un entrenudo o de las hojas en monocotiledóneas, donde la división mitótica continúa después de haber cesado en tejidos proximales y c) meristemos laterales: cambium vascular y felógeno, los cuales funcionan de manera similar a los intercalares, pero en las orillas de tejidos en desarrollo, dando lugar al xilema y floema secundarios y al súber, respectivamente (Sussex y Kerk, 2002; Taiz y Zeiger, 2010; Zlotnik y Ponce, 2013 a).

Algunos meristemos tienen la capacidad de perpetuarse a sí mismos, por lo que se les considera permanentes en el cuerpo de la planta, otorgándole la capacidad de crecer indeterminadamente, como es el caso de los meristemos apicales y el cambium vascular. Por su parte, existen meristemos en los que la división celular se detiene una vez que la estructura a formar alcanza el tamaño y forma

predeterminada genéticamente, como en la formación de las láminas de las hojas y sus peciolo y órganos florales. A este tipo de crecimiento se le conoce como determinado (Beck, 2010).

Meristemo apical del tallo

El meristemo apical del tallo de la mayoría de las angiospermas presenta una estructura túnica-carpus. Las regiones túnica y carpus se distinguen por sus planos de división celular. La túnica consiste en una o más capas de células en la periferia cuya división es anticlinal, es decir su plano de división es perpendicular a la superficie del meristemo. Estas divisiones contribuyen al crecimiento de la superficie del órgano en cuestión, sin aumentar el número de capas celulares en el meristemo. El carpus consiste de una masa de células de varias capas de profundidad debajo de las capas de la túnica, las cuales se dividen en varios planos y añaden volumen al meristemo. Conforme éstas células se dividen, las células más viejas se incorporan a las regiones por debajo del meristemo apical (Esau, 1977; Fahn, 1990; Raven *et al.*, 2005) (fig.3).

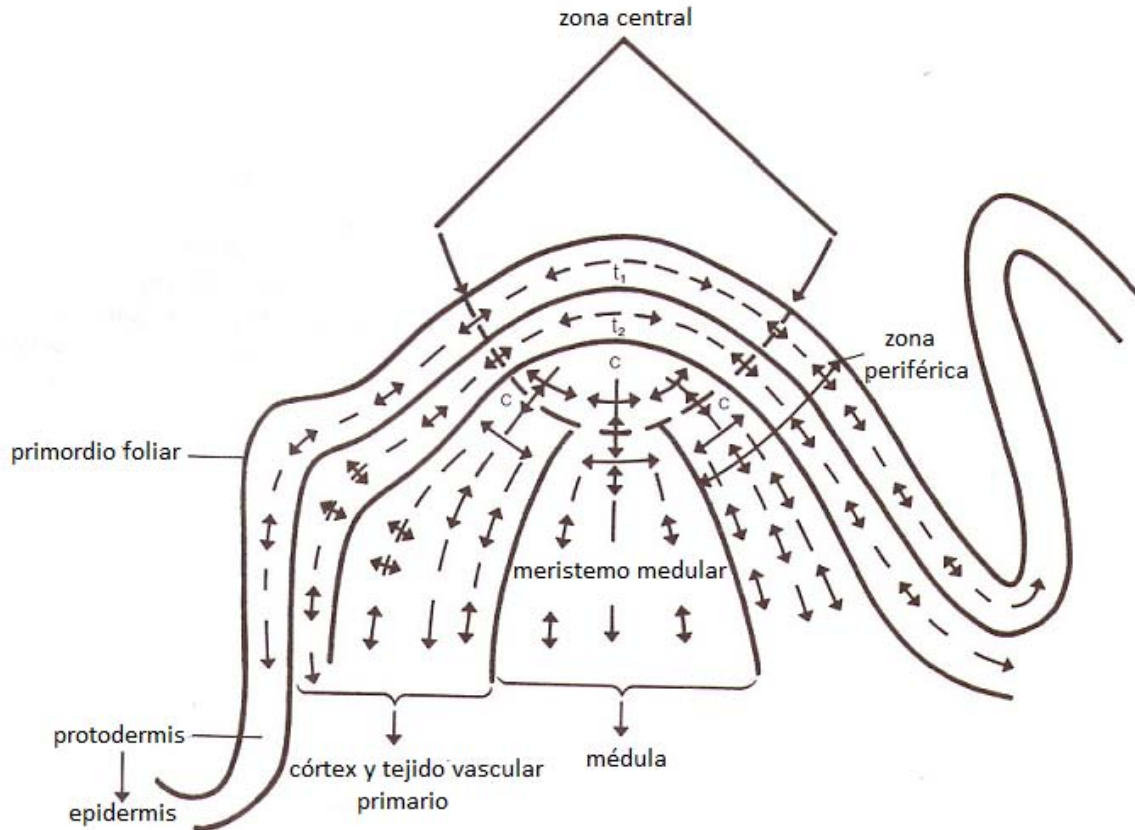


Figura 3. Esquema de la organización túnica-corpúsculo de una angiosperma hipotética con dos capas de túnica. La distancia entre las puntas de las flechas indica el grado de actividad mitótica: a menor distancia, mayor actividad mitótica. Se indica la contribución de cada región del meristemo a la formación de tejidos y regiones del tallo. t1: primera capa de la túnica, t2: segunda capa de la túnica, c: corpúsculo. Modificado de Gifford y Foster (1989).

Meristemo subapical de la raíz

El meristemo de la raíz es subapical, ya que se encuentra antes del ápice de las raíces, protegido por una cofia, también llamada caliptra, formada por células con una gran cantidad de mucílago que sirve para lubricar a las raíces conforme

penetran al sustrato. Dichas células tienen una alta tasa de recambio y presentan estatolitos: granos de almidón que orientarán el crecimiento de la raíz en respuesta a la gravedad (Zlotnik y Ponce, 2013b). En cuanto a la estructura del meristemo *per se*, en monocotiledóneas y varias eudicotiledóneas, se identifican 3 filas de células iniciales que dan lugar a tejidos determinados, cuyo origen puede ser rastreado en cada una de éstas filas, recibiendo el nombre de meristemas cerrados, y, en algunos taxa únicamente existe una región de células iniciales que da lugar a los tejidos de la raíz de manera general, conocidos como meristemas abiertos (Beck, 2010).

Se ha observado que las células iniciales en el meristemo de la raíz se dividen a una muy baja frecuencia, y están rodeadas de células con una alta tasa de división. A ésta región en conjunto se le conoce como centro quiescente, y al centro quiescente junto con las células iniciales circundantes, donde la organogénesis comienza, se le da el nombre de promeristemo, que puede considerarse como el meristemo funcional integrado de la raíz (Scheres *et al.* 1996; Beck, 2010).

Células meristemáticas

Las células meristemáticas se caracterizan por tener paredes delgadas, presentan una forma más isodiamétrica que la de tejidos maduros, y tienen un protoplasma más abundante. Generalmente sus protoplastos carecen de materiales de reserva y cristales, y los plástidos se encuentran en etapa de proplastidios. Particularmente en los meristemas apicales de angiospermas es común que el tamaño de las vacuolas sea pequeño, y que éstas se encuentren dispersas en el

protoplasma (Fahn, 1990), El retículo endoplásmico es escaso y las mitocondrias tienen pocas crestas (Evert, 2006).

Expresión génica en el meristemo apical del tallo

Existen muchos genes encargados de regular el desarrollo y mantenimiento del meristemo apical del tallo, sin embargo, se destacan tres factores de transcripción descritos para *Arabidopsis thaliana*. Uno de ellos es el factor codificado por *WUSCHEL* (*WUS*), el cual se expresa en la región subapical desde que el embrión consiste de 16 células. Posteriormente factores de transcripción de la clase NAC (familia de factores de transcripción específicos de plantas implicados en el desarrollo, defensa y respuesta a estrés abiótico (Olsen *et al.* 2005)), codificados por *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) 1, 2 y 3 se expresan en una banda en la región apical entre los cotiledones. Finalmente, durante la etapa de corazón, la secuencia de activación de genes concluye con otra clase de factores de transcripción codificada por *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), el cual se expresa en un dominio circular dentro del dominio de expresión de *CUC* (Taiz y Zeiger, 2010). Juntos, *WUS* y *STM* ayudan al mantenimiento del tejido meristemático. *WUS* especifica a cierto número de células como meristemáticas y *STM* actúa como antagonista de la diferenciación celular y permite así la proliferación de las células meristemáticas. Así, las células meristemáticas periféricas no se incorporan prematuramente en la formación de tejidos, e incrementan en número (Lenhard *et al.*, 2002). Aquellas plantas mutadas con pérdida de función del gen *STM* dan lugar a embriones sin meristemo apical del

tallo; los cotiledones están fusionados y las células del ápice son diferenciadas (Byrne *et al.*, 2000; Lenhard *et al.*, 2002).

STM y sus ortólogos son buenos marcadores genéticos para el meristemo apical del tallo, ya que desempeñan un papel crucial en la promoción de la división celular en el meristemo apical de eudicotiledóneas (Scofield y Murray, 2006; Veit, 2009; Katayama *et al.*, 2013).

Meristemos en Podostemaceae

Las angiospermas tienen en común sistemas de brotes aéreos y raíces subterráneas. El sistema aéreo de la planta (brote) se origina a partir del meristemo apical del tallo, mientras que el sistema subterráneo se deriva del meristemo subapical de la raíz (Zlotnik y Ponce, 2013a). Sin embargo, generalmente en las podostemáceas esto no es así. Los cuerpos de estas plantas presentan adaptaciones para la vida en los ríos de corriente rápida sobre la superficie de las rocas, y las novedades morfológicas requieren de cambios en el desarrollo (Katayama *et al.*, 2010).

En cuanto al desarrollo de los brotes, hay dos patrones dentro de la familia Podostemaceae: las subfamilias Tristichoideae y Wedellinoideae presentan un crecimiento mediante el meristemo apical del tallo el cual posee la organización túnica-carpus presente en la mayoría de las angiospermas. En la subfamilia Podostemoideae no existe un meristemo apical del tallo con estructura túnica-carpus (Imaichi *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2010), y tiene dos patrones: algunos miembros, como *Zeylanidium lichenoides* presentan un meristemo apical del tallo

críptico, el cual consta únicamente de un centro organizador y no exhibe una capa de células L1 (túnica), mientras que otros, como los del género *Hydrobryum* no presentan meristemo apical del tallo (Suzuki *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2011).

El estudio de la expresión génica en el meristemo apical de Podostemaceae ha aclarado algunos aspectos sobre la identidad y localización de sus estructuras. Katayama *et al.* (2010) estudiaron la expresión de los genes ortólogos de identidad meristemática *STM* y *WUS*, así como los genes *ARP* (*ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEATH2/PHANTASTICA*) típicos de identidad de hojas, en plantas adultas de *Terniopsis minor* (Tristichoideae), *Hydrobryum japonicum* y *Cladopus doianus* (Podostemoideae), encontrando que en los miembros de Podostemoideae estudiados los genes de identidad del meristemo apical se expresan, pero ésta se detiene al comenzar la de los genes *ARP*, lo cual da lugar a brotes con identidad de hoja. A este comportamiento meristemático se le da el nombre de **meristemo simpodial del tallo**, el cual proponen da lugar a una cadena de hojas con identidad tallo-hoja las cuales se forman repetitivamente por la proliferación de los meristemos simpodiales del tallo en la parte adaxial de los preexistentes.

Katayama *et al.* (2013) analizaron la expresión del gen ortólogo de *STM*; *ZISTM* por medio de hibridación *in situ* en embriones de *Z. lichenoides*, encontrando que presenta un meristemo apical del tallo críptico sin una capa de células apicales iniciadoras típica en el embrión, entre la base de los cotiledones durante la embriogénesis, y en el embrión maduro aún dentro de la cubierta seminal. Durante el desarrollo del vástago, la expresión de este gen no se mantuvo en el meristemo, sino que cambió a la base de los cotiledones en su parte adaxial en la zona de

formación de las hojas plumulares, cuyos primordios al desarrollarse consumieron el meristemo del tallo por completo, causando su ausencia en etapas posteriores del desarrollo. A partir de la tercera hoja, las hojas plumulares se desarrollaron en la base de la segunda hoja más joven. De acuerdo a la expresión de *ZISTM* se concluyó que el ápice del tallo en el embrión mantiene parcialmente la identidad meristemática de un meristemo apical del tallo, y que éste comprende el centro organizador, pero sus capas celulares no presentan una estructura típica, ni se mantiene durante el desarrollo primario del brote.

En la subfamilia Podostemoideae, la ausencia de una raíz primaria en el embrión revela la ausencia de un meristemo subapical de la raíz. La raíz de la planta adulta se origina a partir de una raíz de origen endógeno o exógeno, dependiendo de la especie, que se forma directamente del hipocótilo en etapas avanzadas de la germinación (Rutishauser, 1997; Suzuki *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2011). No existen análisis con marcadores para meristemas radiculares que aclaren la expresión de genes típicos de éstos órganos en el polo radicular, ni en el meristemo subapical de la raíz de la planta adulta en Podostemaceae, la cual tiene origen a partir de la raíz adventicia que surge del hipocótilo.

JUSTIFICACIÓN

Dado que en algunos miembros de Australia y Asia de la subfamilia Podostemoideae se ha reportado la ausencia del meristemo apical del tallo y subapical de la raíz, este trabajo se avoca a averiguar si este patrón se presenta también en los miembros del nuevo mundo, usando como modelo a *Marathrum rubrum*, y aportar información que indique que ésto puede ser un patrón general para toda la subfamilia.

HIPÓTESIS

Si las podostemáceas de Australia y Asia de la subfamilia Podostemoideae carecen de meristemas apical del tallo y subapical de la raíz con la estructura típica de las angiospermas, se espera que *Marathrum rubrum*, Podostemoideae americana, presente la misma condición.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la estructura y ultraestructura de los meristemas apical del tallo y subapical de la raíz en embriones de semillas maduras y plántulas de *Marathrum rubrum*, subfamilia Podostemoideae.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la estructura de los meristemas de embriones de *M. rubrum* con lo reportado para especies de Australia y Asia de la subfamilia Podostemoideae.
- Analizar si corresponde a alguno de los modelos de desarrollo propuestos para especies de Australia y Asia.

MÉTODO

Material biológico

Se colectaron frutos maduros de *Marathrum rubrum* en el Río Horcones, Municipio de Cabo Corrientes (20°27'12.1"N, 105°17'23.9"O; 371msnm), en el estado de Jalisco, México (fig. 4), en enero de 2013 y 2014. Se conservaron a temperatura ambiente en bolsas de papel estraza, posteriormente se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas herméticas de plástico.



Figura 4. Localidad Los Horcones, donde se llevó a cabo la colecta de material de *M. rubrum* (Mapa modificado de Villanueva-Arciniega, 2013).

Germinación

Se extrajeron las semillas de *M. rubrum* de los frutos colectados y se pusieron a germinar en cajas Petri con servilletas Kleenex Duramax®, hidratadas con agua Bonafont®.

Las cajas Petri se colocaron en una incubadora Thermo Scientific Precision con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad a 25°C, e intensidad lumínica promedio de $29.06 \mu\text{M s}^{-1}\text{m}^{-2}$.

Se observó y dio seguimiento a la germinación, desde la imbibición, hasta la emergencia del polo radicular y la posterior elongación de los cotiledones, evento que se presentó a los 13 días bajo condiciones de cultivo. Cada una de las etapas fue registrada con fotografías al microscopio estereoscópico.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se fijaron en FAA (Fórmula en Anexo 1) ejemplares de cada una de las cuatro etapas observadas, así como plántulas de etapas más avanzadas que ya habían desarrollado un número mayor a tres hojas (17 días de cultivo), se deshidrataron en una serie de alcohol etílico (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, durante 30 minutos en cada uno y dos cambios en etanol al 100% de una hora) (López Curto *et al.*, 2005), posteriormente se deshidrataron a punto crítico con CO₂ en una desecadora Sandri 795, se cubrieron con oro en una ionizadora Jeol fc-1100 y se observaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6360 LV.

Procesamiento de material para su observación al microscopio de fotones

Para la observación de cortes en microscopía fotónica de campo claro se utilizaron embriones de las distintas etapas fijadas en FAA, las cuales se deshidrataron en la serie de alcohol etílico descrita anteriormente, y se incluyeron gradualmente en mezclas de LR-White/etanol absoluto (25:75, 50:50, 75:25 y 100:0). Se realizaron cortes semifinos de 0.25 μm de grosor con navajas de vidrio en un ultramicrotomo RMC MT-990, y se tiñeron con azul de toluidina 0.5% para su observación.

Análisis de la ultraestructura

Se fijaron plántulas en la etapa de elongación de cotiledones con Glutaraldehído-Paraformaldehído durante 24 horas (Fórmula en Anexo 1), se lavaron tres veces con buffer PBS 1X (Fórmula en Anexo 1) durante 15 minutos y se deshidrataron con la serie de alcoholes previamente descrita, posteriormente el material se incluyó gradualmente en LR-White y se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm de grosor en un ultramicrotomo Reichert-Jung UltracutE con navajas de vidrio y se montaron en rejillas de cobre de 100 mesh cubiertas con formvar. Los cortes se contrastaron con uranilo y plomo (Fórmula en Anexo 1), dejando durante 20 minutos la cara opaca de cada rejilla en acetato de uranilo en cámara húmeda, se enjuagó con agua destilada durante un minuto, posteriormente se colocó durante 10 minutos en citrato de plomo en presencia de hidróxido de sodio y se enjuagó con agua destilada durante un minuto. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL JEM-1010 y el registro de imágenes se realizó con una cámara MTI CCD-300-RC.

RESULTADOS

Germinación

Se observó y registró la secuencia de eventos de la germinación de las semillas de *M. rubrum* (fig. 5). Al entrar en contacto con el agua se da la hidratación del mucílago de la cubierta seminal (figs. 5B y 5F), el cual tiene funciones de adhesión y absorción del agua, para que ésta esté disponible para la imbibición de la semilla (Reyes-Ortega *et al.*, 2009). El mucílago persiste hasta que la cubierta seminal se desprende (figs. 5D y 5H). La germinación de la semilla, posterior a la hidratación, consiste en la imbibición; evento apreciable por un ligero aumento de tamaño (figs. 5B y 5F). Posteriormente emerge el polo radicular mientras que la cubierta seminal permanece cubriendo a los cotiledones (figs. 5C y 5G). Los cotiledones se elongan y comienzan a emerger pelos adhesivos directamente del hipocótilo en el polo radicular. No hay un cambio apreciable de tamaño en el hipocótilo. Una vez que los cotiledones se elongan, la cubierta seminal permanece adherida a la parte superior de éstos, pero en ésta etapa, a diferencia de las previas, se desprende fácilmente (figs. 5D y 5H).

Después, se observa el surgimiento de una primera hoja en el punto medio entre los cotiledones, en el sitio donde a lo largo de los eventos de la germinación se localizan células morfológicamente distintas (CMD) a las circundantes (figs. 6E y 6F).

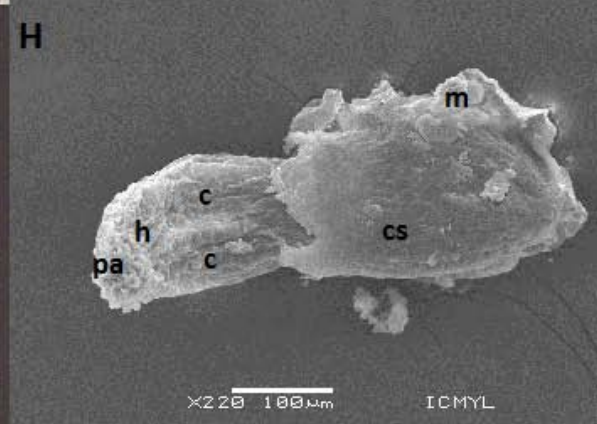
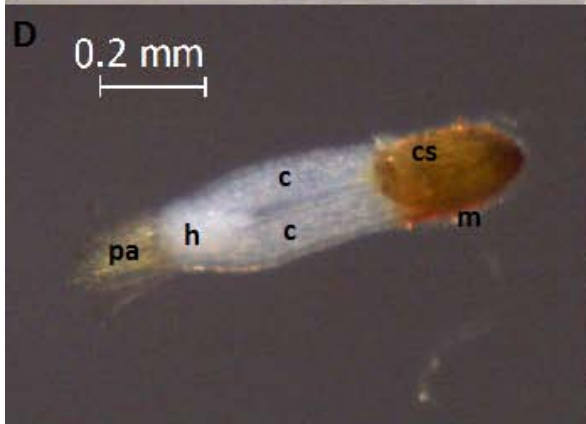
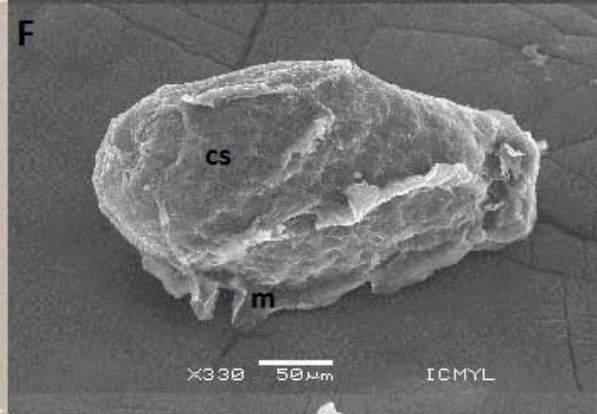
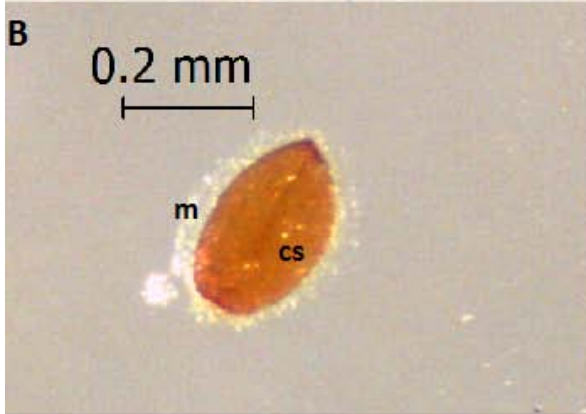
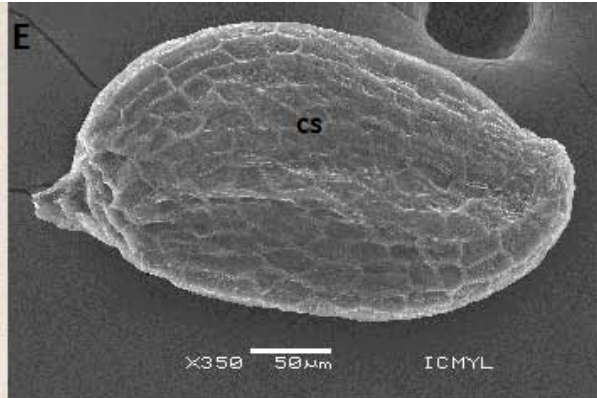
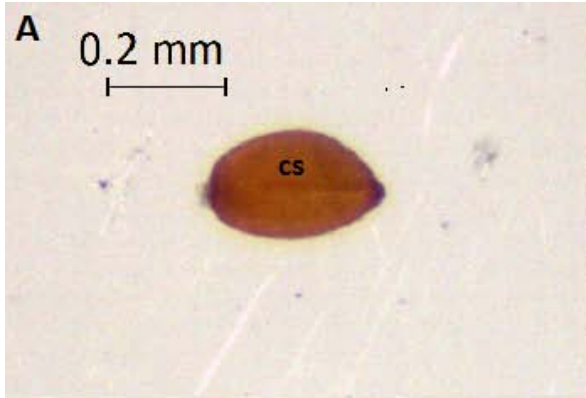


Figura 5. Etapas de la germinación de *M. rubrum* al microscopio estereoscópico (A, B, C, D) y al microscopio electrónico de barrido (E, F, G, H). A y E: semilla deshidratada. B y F: semilla hidratada con mucílago alrededor. C y G: emergencia del polo radicular. D y H: elongación de cotiledones. c: cotiledón, cs: cubierta seminal, h: hipocótilo, m: mucílago, pa: pelos adhesivos.

Anatomía del embrión

El embrión consiste de dos cotiledones y el hipocótilo, encerrados por una cubierta seminal. Su desarrollo se dividió en cuatro etapas principales:

1. Semilla deshidratada: el embrión se encuentra dentro de la cubierta seminal, presenta dos cotiledones y el hipocótilo. El exterior de la cubierta seminal presenta una capa de células epidérmicas deshidratadas (fig. 6A).
2. Semilla embebida: la semilla aumenta de tamaño, no hay cambio en cuanto a la estructura de cotiledones e hipocótilo. La cubierta exterior de las células epidérmicas se hidrata formando el mucílago (fig. 6B).
3. Emergencia del polo radicular: el hipocótilo se elonga y rompe la cubierta seminal (fig. 6 C).
4. Elongación de cotiledones: Los cotiledones se elongan, sin desprenderse de la cubierta seminal en su parte superior. Aumentan en longitud aproximadamente cuatro veces su tamaño en comparación a las etapas anteriores. En el polo radicular surgen pelos adhesivos (fig. 6 D).

Anatomía del polo apical

En cada una de las etapas analizadas los embriones presentan un grupo de células en el punto medio entre los cotiledones que son morfológicamente distintas a las células circundantes; su tamaño es menor en comparación con las células circundantes, y sus núcleos son grandes con respecto al citoplasma y bien definidos. Es de esta región de donde se origina la primera hoja que se observa en el embrión, pero la organización celular en esta zona no coincide con la estructura

de un meristemo con organización túnica-carpus, donde la túnica consiste de células con solo divisiones anticlinales y el carpus con células en todos los planos de división (figs. 6A-D y 6F). Tampoco corresponde a un epicótilo puesto que no hay primordios de hojas que lo acompañen.

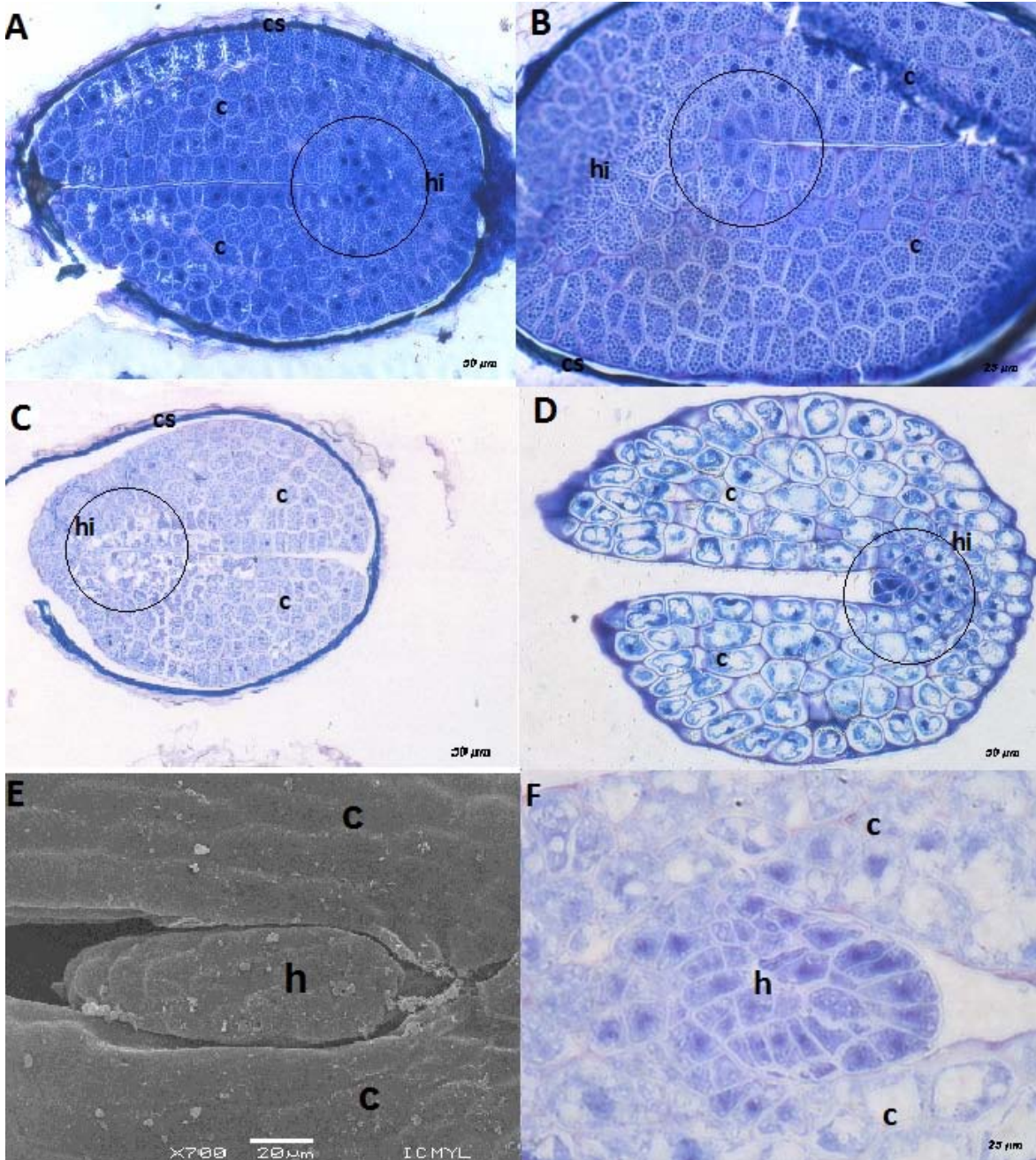


Figura 6. Embrión de *M. rubrum* (A, B, C y D), se circulan las células morfológicamente distintas (CMD). A: embrión de semilla deshidratada. B: embrión de semilla hidratada. C: embrión en etapa de emergencia del polo radicular. D: embrión en etapa de elongación de cotiledones. E: sitio de inserción de la primera hoja entre los cotiledones (MEB) F: inserción de la primera hoja en el punto medio de los cotiledones. c: cotiledones; cs: cubierta seminal; h: hoja; hi: hipocótilo.

Anatomía del polo radicular

En el polo radicular no hay presencia de un meristemo subapical de la raíz en ninguna de las etapas estudiadas. La diferenciación consiste solamente en la elongación de algunas de sus células epidérmicas que se desarrollan en pelos adhesivos unicelulares, estructuras de fijación que crecen directamente del hipocótilo (fig. 7).

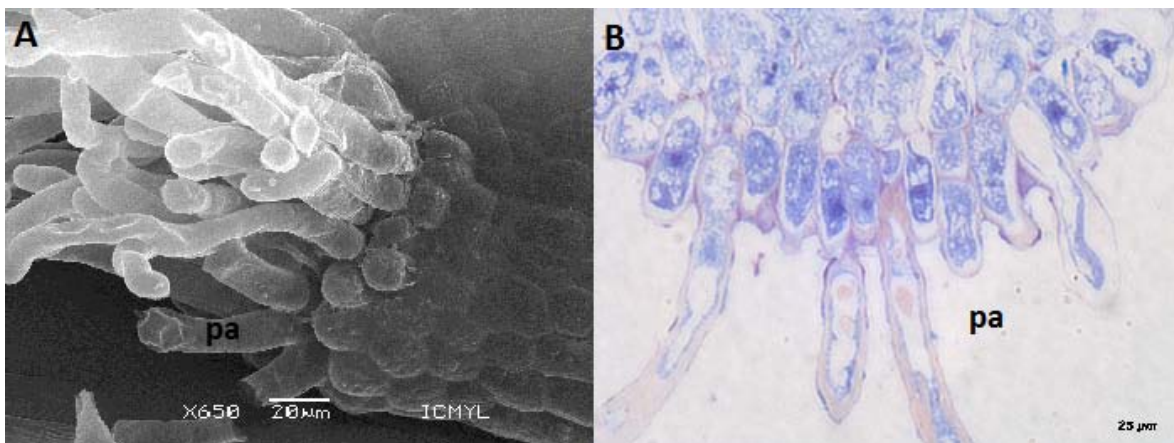


Figura 7. Microfotografías del polo radicular de *M. rubrum* en etapa de elongación de cotiledones al MEB (A) y en corte longitudinal al microscopio fotónico (B). pa: pelos adhesivos.

Ultraestructura del polo apical

Se realizaron cortes ultrafinos de la plántula en etapa de elongación de cotiledones, por ser ésta, en donde el número de CMD entre los cotiledones era mayor y se analizó su ultraestructura al MET para determinar su identidad, así como contrastar sus características con las de los otros tipos celulares circundantes.

Las CMD presentan paredes primarias delgadas, tamaños pequeños en comparación con las células circundantes, escaso material de reserva, escasas y pequeñas vacuolas (figs. 8A y 8B).

Existen diferencias a su vez a nivel nuclear; las células meristemáticas presentan núcleos con una cantidad mayor de heterocromatina que las células parenquimáticas, y en ningún caso es evidente la presencia de un nucléolo (figura 8A).

Las células parenquimáticas circundantes son de mayor tamaño, presentan núcleos con una mayor cantidad de eucromatina y nucléolos bien definidos. A su vez, en el citoplasma las células presentan numerosos ribosomas (fig. 8C-8E).

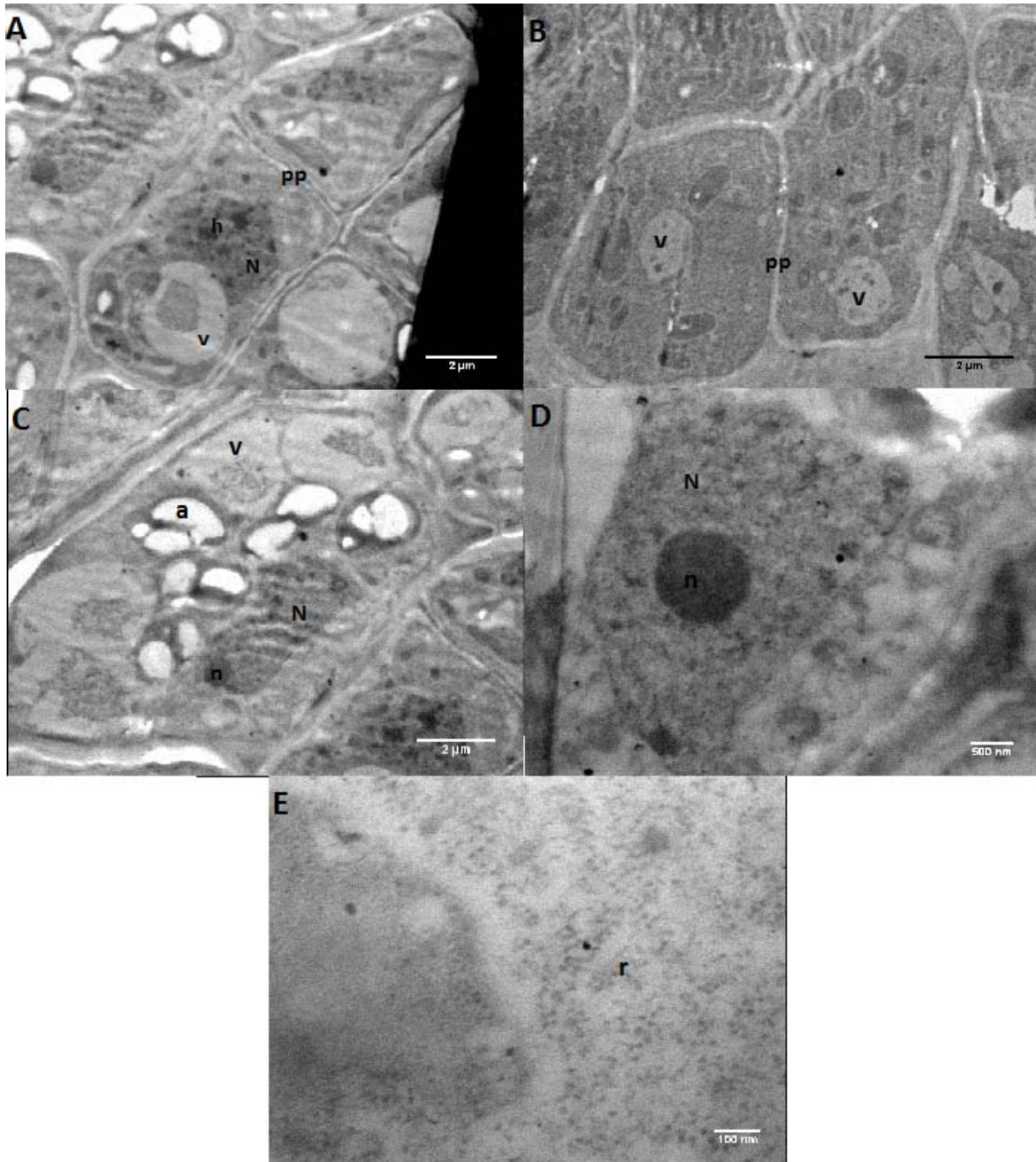


Figura 8. Células meristemáticas (A y B), y células parenquimáticas (C-E). C: célula parenquimática. D: núcleo de célula parenquimática. E: ribosomas en citoplasma de célula parenquimática. a: almidón; h: heterocromatina; N: núcleo; n: nucléolo; pp: pared primaria; v: vacuola.

Desarrollo posterior de las primeras hojas.

La primera hoja de la plántula surge en el punto medio entre los cotiledones, y las siguientes hojas se desarrollan adyacentes, cada una de las hojas surge de la base de la hoja más joven, última en haberse desarrollado.

Exceptuando a la primera hoja, las demás se bifurcan desde su surgimiento.

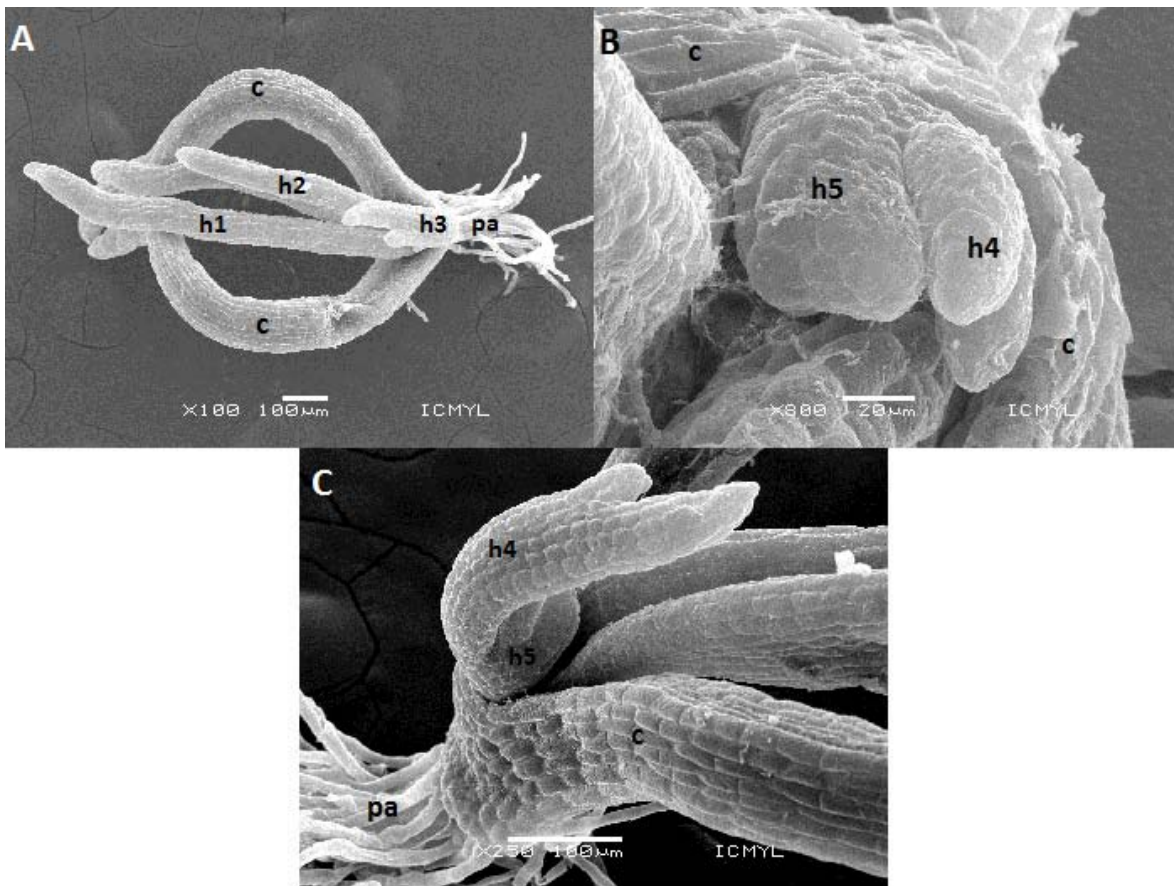


Figura 9. Primeras hojas de *M. rubrum* (MEB). A: plántula completa. B: cuarta y quinta hojas de la plántula en etapa temprana de su crecimiento. Quinta hoja surge de la base de la cuarta. C: cuarta y quinta hoja de la plántula con desarrollo más avanzado que en B. c: cotiledón; h: hoja (el número corresponde con el orden de surgimiento); pa: pelos adhesivos.

DISCUSIÓN

La estructura del embrión en *M. rubrum* se corresponde con el modelo propuesto para las podostemaceas de Australia y Asia (Katayama *et al.*, 2011) y, particularmente, para los miembros de la subfamilia Podostemoideae. En él se describen dos modelos uno en el cual la estructura del meristemo apical del tallo es críptica y carece de una capa de células L1, éste es determinado y da origen a unas cuantas hojas; el meristemo subapical de la raíz está ausente y una raíz adventicia se desarrolla a partir del hipocótilo. En el otro modelo, no se desarrolla un meristemo subapical de la raíz ni un meristemo apical del tallo y la planta se desarrolla únicamente a partir de una raíz adventicia que surge del hipocótilo. Precisamente, *M. rubrum* se identifica con el primer modelo, ya que presenta un meristemo apical del tallo críptico que carece de estructura túnica-carpus, pero de éste se originan las primeras hojas de la plántula, que, hasta los 17 días que duró el experimento, produjo cuatro hojas. Katayama *et al.* (2013), fueron los primeros en analizar la identidad de las células meristemáticas en el embrión de un miembro de la subfamilia Podostemoideae, así como el patrón de surgimiento de las primeras hojas a partir de éste, utilizando como modelo a *Z. lichenoides*, por lo cual, sería el único modelo existente con respecto al surgimiento de las primeras hojas embrionarias a partir del meristemo embrionario críptico. Lo observado en *M. rubrum* indica que existe otra variante en el patrón de surgimiento de las primeras hojas en la subfamilia Podostemoideae: la primera hoja de la plántula surge exactamente en el punto medio entre los cotiledones, al contrario de lo que sucede en *Z. lichenoides* donde el meristemo críptico se desplaza hacia la base de

los cotiledones, de donde surgen las primeras hojas (Katayama *et al.*, 2013). Con respecto al meristemo subapical de la raíz, *M. rubrum* coincide con el modelo de Podostemoideae, ya que el embrión carece de este meristemo (fig. 10).

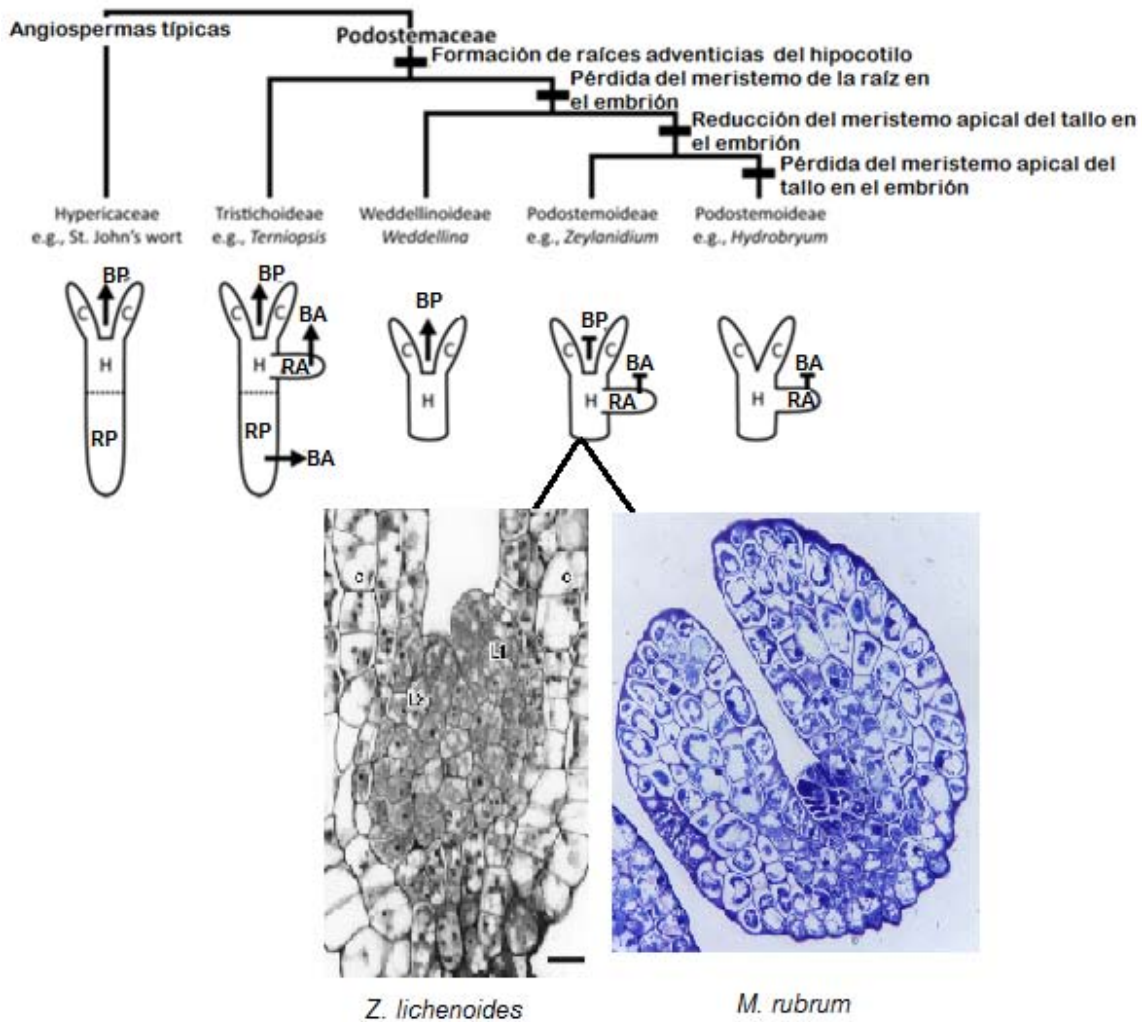


Figura 10. Esquema modificado de Katayama *et al.* 2011 comparando los resultados obtenidos por Katayama *et al.* (2013), con los del presente trabajo. *Z. lichenoides* presenta el meristemo apical del tallo en la base de los cotiledones. *M. rubrum* presenta el meristemo apical de tallo en el punto medio entre los cotiledones.

Cabe señalar que en este trabajo se utiliza el término primera hoja, para referirse a lo que se denomina en la literatura referente a Podostemaceae como plúmula, ya que la definición de plúmula se refiere a ésta como el brote primordial en el polo caulinar del embrión, situado dentro de la semilla (Evert, 2006), y la primera hoja en *M. rubrum* surge hasta que la semilla germina.

En cuanto al desarrollo posterior de una raíz adventicia, ésta no fue observada por nosotros en el tiempo de estudio; cabe señalar que las condiciones de cultivo usadas en este trabajo fueron distintas a las de aquellos estudios en los que esta estructura fue observada. En el desarrollo de esta investigación, las semillas analizadas de *M. rubrum* se cultivaron en servilletas de papel humedecidas con agua potable, con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad, mientras que aquellos estudios donde se reporta el surgimiento de una raíz adventicia lo hicieron en agar cubierto con medio de cultivo líquido y un fotoperiodo de 14h luz/10h oscuridad (Suzuki *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2013). Sin embargo, puede suponerse que una raíz adventicia surge del hipocótilo como en los otros miembros de Podostemoideae para el establecimiento de la planta adulta, únicamente que en etapas posteriores de desarrollo.

En el desarrollo posterior de las hojas cuyo origen es el embrión, el patrón en *M. rubrum* es que a partir de la segunda hoja, cada nueva hoja se desarrolla a partir de la base de la hoja previa más joven. No existe un reporte de este patrón de desarrollo de las hojas en el embrión de las Podostemoideae, únicamente en el surgimiento de las hojas en la planta adulta (Katayama *et al.*, 2010). Esto podría indicar que el patrón de surgimiento de las hojas, en el cual las células

meristemáticas se encuentran en la base de las hojas previas y no concentradas en un meristemo apical del tallo, podría ser un patrón extendido en el desarrollo no sólo en el cuerpo adulto de la planta cuyo origen es secundario (a partir de la raíz adventicia que surge del hipocótilo), sino también en el cuerpo primario de la plántula, presentándose desde el desarrollo directo a partir del embrión, esto indicaría que es un patrón general en los meristemas de la subfamilia Podostemoideae.

Tristichoideae y Wedellinoideae presentan una ramificación simpodial en la planta adulta. Katayama *et al.* (2010) proponen que el patrón de surgimiento de las hojas en Podostemoideae se deriva de éste patrón, dando lugar en vez de tallos a hojas con identidad de tallos. Proponen la existencia de un meristemo simpodial del tallo en Podostemoideae. Lo cual coincidiría con lo observado durante el desarrollo temprano de las hojas en *M. rubrum* en donde cada hoja se origina de la base de la hoja más joven.

En las observaciones al MEB del polo radicular pudo apreciarse una continuidad entre las células epidérmicas y los pelos adhesivos, por medio de la observación de cortes de esta estructura, se confirmó su origen como prolongaciones de las células epidérmicas del hipocótilo, coincidiendo con lo reportado para *Dalzellia zeylanica* (Tristichoideae), especie donde los pelos adhesivos se originan directamente de las células epidérmicas del polo radicular (Uniyal y Mohan Ram, 1996). Suzuki *et al.* (2002) estudiaron el desarrollo de nueve especies de la subfamilia Podostemoideae, y realizaron cortes longitudinales de sus embriones; en éstos, a pesar de que no se discute en la publicación, es posible observar el

origen epidérmico de los pelos adhesivos: las primeras estructuras de fijación en el embrión en ausencia de una raíz primaria.

En lo referente al meristemo apical del tallo, la estructura en las etapas de la germinación analizadas se observó un cúmulo de células morfológicamente distintas a las circundantes en el punto medio entre los cotiledones, región ocupada por el meristemo apical del tallo en una angiosperma típica (Márquez, 2013); al observar cortes ultrafinos al MET en esta zona se detectó la presencia de células meristemáticas, identificadas por su ultraestructura, contrastándola con la de los otros tipos celulares presentes en el embrión en etapa de elongación de cotiledones. Dichas células presentan las características de las células en división: el material genético se encuentra compactado, observándose altos niveles de heterocromatina; no se observa un nucléolo dentro del núcleo; el material de reserva en vacuolas es muy escaso; y la pared celular primaria es delgada, lo cual indica que las células con actividad meristemática se localizan en el punto medio de los cotiledones y no tienen una organización túnica-copus.

Este estudio aporta información sobre la actividad meristemática en especies americanas, y no se cuenta con reportes previos que permitan realizar comparaciones. Koi y Kato (2007) hacen una propuesta sobre la evolución del meristemo apical del tallo en Podostemaceae en la que incluyen a las Podostemoideae americanas, usando como especie representativa a *M. rubrum* basándose en el trabajo de Rutishauser (1995), sin embargo, en dicho trabajo no se analiza en sí la actividad, ni la estructura meristemática, sino el patrón de surgimiento de las hojas de la planta adulta de esta especie, y la mención de la

estructura meristemática se hace únicamente como una hipótesis. Dado lo anterior, este trabajo es el primero en arrojar luz sobre este tema para dilucidar lo que ocurre en particular en *M. rubrum* y abre la interrogante sobre su ocurrencia en las especies de Podostemoideae americanas.

CONCLUSIONES

Marathrum rubrum es una Podostemoideae que presenta un meristemo apical del tallo críptico.

El meristemo apical del tallo en el embrión se encuentra en el punto medio de los cotiledones, contrastando con lo reportado para *Zeylanidium lichenoides* (Katayama *et al.*, 2013) representando una nueva disposición del meristemo apical del tallo en el embrión de las Podostemoideae que presentan meristemo apical del tallo.

Las primeras hojas que se desarrollan a partir del embrión surgen de la base de la hoja anterior más joven, sugiriendo un desplazamiento de la actividad meristemática a la base de las mismas.

Los pelos adhesivos se originan como prolongaciones de las células epidérmicas, y aparentemente su función es la fijación de la plántula.

No existe un meristemo subapical de la raíz en el embrión.

BIBLIOGRAFÍA

- Beck C. B. 2010. An Introduction to Plant Structure and Development. 2a Edición. Cambridge University Press. Reino Unido. 441 pp.
- Byrne M. E., R. Barley., M. Curtis, J. M. Arroyo, M. Dunham, A. Hudson y R. Martienssen. 2000. Asymmetric leaves¹ mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408(6815): 967–971.
- Castillo G., J. Márquez-Guzmán y M. Collazo Ortega. 2013. Seed germination and early development in seedlings of *Noveloa coulteriana* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 109: 25-30.
- Esau K. 1977. Anatomy of Seed Plants. 2da ed. John Wiley & Sons. Canadá. 550 pp.
- Evert R. F. 2006. Esau's Plant Anatomy. 3a Edición. Wiley. Nueva Jersey. 624 pp.
- Fahn A. 1990. Plant Anatomy. 4a ed. Pergamon Press. Gran Bretaña. 588 pp.
- Gifford E., A. Foster. 1989, Morphology and Evolution of Vascular Plants. 3a ed. W.H. Freeman and Company. EUA. 626 pp.
- Gustafsson M., V. Bittrich y P. Stevens. 2002. Phylogeny of Clusiaceae based on rbcL sequences. *International Journal of Plant Sciences* 163(6): 1045–1054.
- Hammond B. 1936. Regeneration of *Podostemon ceratophyllum*. *Botanical Gazette* 97(4): 834- 845.
- Imaichi R., Y. Hiyama y M. Kato. 2005. Leaf Development in the Absence of a Shoot Apical Meristem in *Zeylanidium subulatum* (Podostemaceae). *Annals of Botany* 96: 51–58.
- Jäger-Zürn I. y M. Grubert .2000. Podostemaceae depend on sticky biofilms with respect to attachment to rocks in waterfalls. *International Journal of Plant Sciences* 161: 599–607.
- Katayama N., S. Koi y M. Kato. 2010. Expression of SHOOT MERISTEMLESS, WUSCHEL, and ASYMMETRIC LEAVES¹ homologs in the shoots of Podostemaceae: implications for the evolution of novel shoot organogenesis. *The Plant Cell* 22(7): 2131–2140.

- Katayama N., A. 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 and Development* 342: 333–342.
- Katayama N., M. Kato y T.Yamada. 2013. Origin and development of the cryptic shoot meristem in *Zeylanidium lichenoides* (Podostemaceae). *American journal of botany* 100(4): 635–646.
- Kita Y y M. Kato. 2005. Seedling developmental anatomy of an undescribed *Malaccotristicha* species (Podostemaceae , subfamily Tristichoideae) with implications for body plan evolution. *Plant Systematics and Evolution* 254: 221–232.
- Koi S., R. Fujinami, N. Kubo, I. Tsukamoto, R. Inagawa, R. Imaichi y M.Kato. 2006. Comparative anatomy of root meristem and root cap in some species of Podostemaceae and the evolution of root dorsiventrality. *American Journal of Botany* 93(5): 682–692.
- Koi S., M. Kato. 2007. Developmental Morphology of the Shoot in *Weddellina squamulosa* and Implications for Shoot Evolution in the Podostemaceae. *Annals of Botany* 99: 1121-1130.
- Lenhard M., G. Jürgens y T. Laux. 2002. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* 129(13): 3195–3206.
- Les D. H., C. T. Philbrick y A. Novelo. 1997. The phylogenetic position of riverweeds (Podostemaceae)" Insights from rbcL sequence data. *Aquatic Botany* 57 (1-4): 5–27.
- López Curto M. L., J. Márquez Guzmán, G. Murguía Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Las Prensas de Ciencias. México.116 pp.
- Márquez J. 2013. Semilla.En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p:137-149.
- Novelo A y C. T. Philbrick. 1993. A New Species of *Marathrum* (Podostemaceae) from Jalisco, Mexico. *Novon* 3 (4): 456-458.
- Novelo A y C. T.Philbrick.1997. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. *Aquatic Botany* 57(1-4): 275–303.

- Novelo A., C.T. Philbrick y G. E. Crow. 2009. Podostemaceae. En: Flora Mesoamericana, vol. 3, pp. 1–7. Página en red: <http://www.tropicos.org/docs/meso/podostemaceae.pdf?projectid=3&langid=66> Consultado:17 de mayo de 2015.
- Olsen A. N., H. A. Ernst, L.L. Leggio, K. Skriver.2005.NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10(2):79-87.
- Philbrick C.T. y A. Novelo.1997. Ovule number, seed number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquatic Botany* 57:183-200.
- Philbrick C.T. y A. Novelo. 1998. Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 62:199-206.
- Raven P., R. Evert y S. Eichorn. 2005. *Biology of Plants* .7a ed. Nueva York: W.H. Freeman.686 pp.
- Reyes-Ortega I., M. E. Sánchez-Coronado y A. Orozco-Segovia. 2009. Seed germination in *Marathrum schiedeanum* and *M. rubrum* (Podostemaceae).*Aquatic Botany* 90: 13-17.
- Rutishauser R. 1995. Developmental patterns of leaves in Podostemaceae compared with more typical flowering plants: saltational evolution and fuzzy morphology. *Canadian Journal of Botany* 73: 1305-1317.
- Rutishauser R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquatic Botany* 57(1-4): 29–70.
- Savolainen V., M. Fay y D.Albach. 2000. Phylogeny of the eudicots: a nearly complete familial analysis based on rbcL gene sequences. *Kew Bulletin* 55(2): 257-309.
- Scheres B., H. McKhann, C. van den Berg, V. Willemsen, H. Wolkenfelt, G. Vrieze, P. Weisbeek.1996. Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 187 (2): 97-105.
- Scofield S y J. A. H. Murray. 2006. KNOX gene function in plant stem cell niches. *Plant molecular biology* 60(6): 929–946.
- Soltis D., P. Soltis, M.W. Chase, M.E. Mort, D.C. Albach, M. Zanis, V. Savolainen, W. Hahn, S. B. Hoot, M. F. Fay, M. Axtell, S.M. Swensen, L. M. Prince, W. J. Kress, K. C. Nixon y J. S. Farris. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 381–461.

- Sussex I. M. y N.M. Kerk. 2002. The organization and function of plant meristems. En: McManus M. T. y B.E. Veit. 2002. Meristematic Tissues in Plant Growth and Development. Sheffield Academic Press. EUA. 301 pp.
- Suzuki K., Y. Kita, M. Kato. 2002. Comparative Developmental Anatomy of Seedlings in Nine Species of Podostemaceae (Subfamily Podostemoideae). *Annals of Botany* 89: 755-765.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 5a ed. Massachusetts, EUA: Sinauer Associates 782 pp.
- 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.
- Uniyal P. L., H. Y. Mohan Ram. In vitro germination and seedling development of *Dalzellia zeylanica* (Gardner) Wight (Podostemaceae). 1996. *Aquatic Botany* 54: 59-71
- Veit B. 2009. Hormone mediated regulation of the shoot apical meristem. *Plant Molecular Biology* 69(4): 397–408.
- Villanueva-Arciniega U. R. 2013. Desarrollo de la antera y grano de polen en *Noveloa coulteriana* (Podostemaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 64 pp.
- Zlotnik A. y M. Ponce. 2013 a. Tejidos Vegetales. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p:137-149.
- Zlotnik A. y M. Ponce. 2013 b. La raíz. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p:137-149.

ANEXO 1

Reactivos para procesamiento del material utilizado (López Curto *et al.* 2005)

Fórmula de FAA para fijación de material

Formaldehído 100 mL

Alcohol etílico 96% 500mL

Ácido acético glacial 50 mL

H₂O destilada 350 mL

Fórmula de Glutaraldehído-Paraformaldehído para fijación de material

Glutaraldehído al 6%

Amortiguador de colidina* 0.1M a pH 7.2 sin diluir (25 mL)

Paraformaldehído al 4%

Agua destilada (100 mL)

Amortiguador de fosfatos (PBS)

Fórmula de Contrastantes para Microscopia Electrónica de Transmisión

Citrato de Plomo (venable) para 10mL de solución

Agua hervida aislada del CO₂ atmosférico (10mL)

Citrato de Plomo (0.035mg)

NaOH (para facilitar su disolución) (0.01mL)

Acetato de Uranilo 4% para 10mL de solución

Agua bidestilada (10mL)

Acetato de uranilo (400mg)

Buffer de Fosfatos

Na₂PO₄ (9.08g)

H₂O destilada (400mL)

NaH₂PO₄ (2.21g)

H₂O destilada (100mL)

Se obtiene medio litro de fostatos 0.16M, pH 7.2