



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Desarrollo de la semilla de
Marathrum foeniculaceum
(Podostemaceae)

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Biólogo

PRESENTA:
Leonardo Tomás Martínez Trueba

ASESORA:
Dra. Karina Jiménez Durán



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



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.

Contenido

Agradecimientos.....	4
Agradecimientos personales.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
Desarrollo embrionario.....	6
Establecimiento del plan vertical.....	9
Meristemo apical del tallo.....	12
Meristemo subapical de la raíz.....	14
Desarrollo de la cubierta seminal.....	15
Familia Podostemaceae.....	17
Desarrollo embrionario de Podostemaceae.....	17
Antecedentes.....	22
Modificación del plan corporal en Podostemaceae.....	22
Establecimiento del plan corporal vertical y modificaciones en el desarrollo embrionario de Podostemaceae.....	23
Objetivos.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
Materiales y método.....	28
Especie de estudio.....	28
Material biológico.....	29
Procesamiento histológico.....	30
Pruebas histoquímicas.....	30
Microscopía electrónica de barrido.....	31
Resultados.....	32
Desarrollo del proembrión y del suspensor.....	32
Desarrollo del embrión.....	34
División de la hipófisis.....	39

Desarrollo de la cubierta seminal.....	39
Reservas de nutrientes en el embrión.....	42
Discusión.....	44
El meristemo apical es reducido sin estratos de la túnica.....	44
Las hipófisis y sus descendientes pierden la organización que da origen al meristemo radicular.....	46
Modificación en el desarrollo radial.....	47
La presencia del suspensor en etapas avanzadas del desarrollo sugiere su participación en la nutrición del embrión.....	50
La semilla de <i>M. foeniculaceum</i> es mixospérmica.....	52
Los compuestos fenólicos podrían proteger a la semilla.....	54
Conclusiones.....	55
Referencias.....	56

Agradecimientos

Al IQ Iván Puente Lee por su apoyo en el microscopio electrónico de barrido y a la M.C Berenit Mendoza Garfias por el apoyo en el procesamiento de muestras que se usaron en el mismo.

Este trabajo se realizó gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, IN219323.

Agradecimientos personales

A Renata, por acompañarme durante toda mi vida y darme la confianza e inspiración que a veces no puedo encontrar en mí. Desde donde sea que ambos estemos, te encuentras siempre cerca de mi corazón y espero hacer de mi existencia una de la que puedas sentirte orgullosa.

A Estefy, porque has sido esencial en mi formación como biólogo y como persona. Todo el cariño que me has dado no deja de conmoverme hasta el día de hoy y espero poder corresponderte todo el bienestar que nuestra amistad me ha otorgado.

A Dany, por compartirme todo lo bello que encuentras a tu alrededor. Tu compañía es una constante fuente de alegría en cualquier momento y circunstancia, no dejo de admirar todo lo que eres y aspirar a ser más como tú para esparcir el cálido brillo que es tan propio de ti.

A Guadalupe, por haber llegado en el momento en que lo hiciste. Con cada día que pasa me siento más afortunado de que nuestros caminos hayan finalmente coincidido para compartir aquello que es más bello si es que estamos juntos. No pensé que podía ser tan querido como tú me has hecho sentir y cada día espero tú recibas lo mismo de mi parte.

A Kari, por todas las enseñanzas y palabras que me han motivado durante el transcurso de este trabajo. Fue siempre un alivio contar con tu apoyo y estaré siempre agradecido de haber sido tu alumno.

Finalmente, a mi madre y padre ya que a través de su constante apoyo me han permitido continuar con mi formación.

Resumen

A diferencia del resto de las angiospermas, los miembros de la familia Podostemaceae poseen un plan corporal horizontal, el cual consiste de un cuerpo fotosintético aplanado cuyo crecimiento es guiado por raíces adventicias derivadas del hipocótilo. En miembros asiáticos de la subfamilia Podostemoideae, se ha observado que el origen de este plan corporal se debe a cambios en los patrones de división celular que ocurren durante el desarrollo embrionario, lo cual resulta en la reducción y pérdida de los meristemas apical del tallo y subapical de la raíz, respectivamente. Estos cambios no han sido observados en podostemáceas neotropicales, por lo cual en este trabajo se describe el desarrollo de la semilla de *Marathrum foeniculaceum* (Podostemoideae), con distribución en México, y se compara con otros miembros de la subfamilia. La semilla de *M. foeniculaceum* es mixospérmica, los estratos de la cubierta seminal almacenan proteínas y granos de almidón, los cuales desaparecen con la maduración del embrión, el cual acumula proteínas cuando ha madurado. El embrión tiene un meristemo apical del tallo reducido debido a la división de las células precursoras del centro de organización, carece de meristemo subapical de la raíz como resultado de una serie de divisiones verticales en la hipófisis y sus células hijas. También se observó la modificación en la simetría radial del proembrión de 8 células, así como la presencia del suspensor hasta la etapa de torpedo y su posible participación en el transporte de almidón y proteínas de los tejidos maternos hacia el embrión. Las modificaciones de los meristemas primarios de *M. foeniculaceum* son similares a los patrones reportados en miembros asiáticos de Podostemoideae. La permanencia del suspensor y su posible papel en la translocación de nutrientes requiere más investigación para determinar los mecanismos que intervienen en este proceso.

Introducción

La semilla, que se desarrolla a partir del óvulo, es la unidad de dispersión de las espermatofitas. En el caso de las angiospermas, la semilla consiste de cubierta seminal, embrión y tejido nutritivo. La cubierta seminal se forma a partir de los tegumentos y rodea al embrión, el cual se encuentra embebido en el tejido nutritivo, que puede ser el endospermo y/o el perispermo. La cubierta seminal, generalmente constituida por la testa y el tegmen, protege al embrión de daño mecánico, ataques de patógenos y mantiene la latencia del embrión. Los tejidos nutritivos son zonas especializadas en el almacenamiento de sustancias necesarias para el desarrollo del embrión, el cual es un esporofito joven en el que se encuentran diferenciadas las estructuras que darán origen a la planta adulta (Batygina, 2006).

Desarrollo embrionario

El ciclo de vida de las angiospermas consiste en una alternancia de las generaciones esporofítica y gametofítica. De estas dos, la generación esporofítica es la más conspicua y comienza con la doble fecundación de la ovocélula y de la célula central con los núcleos espermáticos, dando origen al embrión y al endospermo, respectivamente (Park y Harada, 2008).

El desarrollo embrionario abarca tres etapas. La primera corresponde a la morfogénesis, en la cual el eje polar de la planta es definido mediante la especificación de los meristemos apical y subapical, en esta etapa también se forman los tejidos y órganos embrionarios. La segunda etapa consiste de la maduración del embrión, en la cual ocurre la acumulación de reservas nutritivas y en la tercera etapa ocurre la deshidratación del embrión y la semilla (West y Harada, 1993). El embrión de las plantas dicotiledóneas está conformado por los órganos responsables de formar las estructuras de una planta madura. El epicótilo corresponde a la porción apical del eje embrionario en donde se encuentra el meristemo apical del tallo, ubicado entre ambos cotiledones,

los cuales son las hojas embrionarias y están situados lateralmente al ápice del embrión. Por debajo de los cotiledones se encuentra el hipocótilo y por debajo está la raíz embrionaria o radícula, en donde se ubica el meristemo subapical de la raíz (Batygina, 2006).

El desarrollo típico del embrión de las angiospermas dicotiledóneas consiste de una serie de etapas sucesivas: el proembrión de una, cuatro y ocho células, seguidas del embrión de 16 células o dermatógeno, la etapa globular, de corazón y de torpedo. (Batygina, 2006).

El patrón general de desarrollo embrionario de las angiospermas se ejemplifica con la embriogénesis de *Brassica napus* (Brassicaceae) (Fig. 1), la cual comienza con la división asimétrica y transversal del cigoto, de la cual resultan una célula apical pequeña y una célula basal de mayor tamaño (Fig. 1A-B). La célula basal da origen al suspensor mediante una serie de divisiones transversales (Fig. 1C-D), el cual es una estructura transitoria y metabólicamente activa que contribuye al desarrollo del embrión con nutrientes y factores de crecimiento mediante plasmodesmos que conectan las células de ambas estructuras (Raven *et al.*, 2013). Las células del suspensor experimentan muerte celular programada durante la etapa de torpedo, excepto la hipófisis, que se encuentra inmediatamente por debajo del embrión y corresponde a la célula más apical del suspensor. Las células descendientes de la hipófisis se incorporan al embrión durante la etapa globular (Fig. 1G) y en esta misma etapa dan origen a las células del centro quiescente, las cuales mantienen la identidad meristemática de las células ubicadas en el meristemo subapical de la raíz (Fig. 1H) (Kawashima y Goldberg, 2010).

El desarrollo de la célula apical, resultante de la primera división del cigoto, continúa con la formación del proembrión y posteriormente del embrión. La primera división de la célula apical ocurre longitudinalmente y es seguida por una segunda división perpendicular respecto a la primera, la cual da origen al proembrión de cuatro células (Fig. 1C). Posteriormente, una división transversal origina al proembrión de ocho

células u octante (Fig. 1E), cuyas células se dividen periclinalmente formando así a la protodermis, la epidermis embrionaria que encapsula a las células internas del embrión que cuenta con 16 células en esta nueva etapa (Fig. 1F). La formación de la protodermis concluye del desarrollo del proembrión (Bhojwani y Bhatnagar, 2000). La etapa globular (Fig. 1G-H) es el resultado del desarrollo radial del embrión, cuya configuración globular emerge por un incremento en tamaño y número de células debido a divisiones anticlinales de la protodermis, así como divisiones longitudinales y transversales de las células internas. Durante esta etapa ocurre la división transversal asimétrica de la hipófisis (Fig. 1G), dando origen a una célula apical con forma de lente, la cual es precursora del centro quiescente (West y Harada, 1993).

En la etapa de transición (Fig. 1J) los cotiledones comienzan a formarse por divisiones periclinales en extremos opuestos del ápice embrionario. La elongación inicial de los cotiledones da origen a la etapa de corazón (Fig. 1J), con lo cual la simetría del embrión cambia de globular a bilateral y su crecimiento continúa en la etapa de torpedo (Fig. 1K). En esta etapa el embrión maduro cuenta con todas las estructuras que conforman el eje apical-basal: el meristemo apical del tallo ubicado entre los cotiledones, hipocótilo y la radícula en cuyo extremo más distal está el meristemo subapical de la raíz (Fig. 1L) (Park y Harada, 2008).

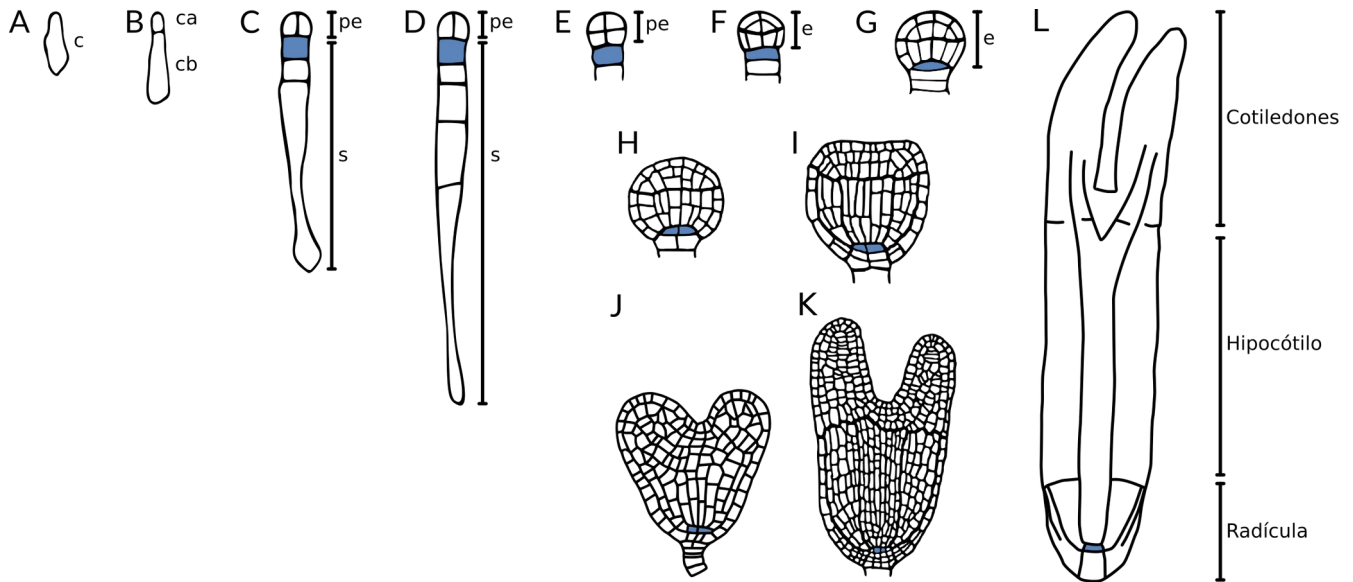


Fig. 1. Etapas del desarrollo embrionario de *Brassica napus*. **A.** Cigoto. **B.** Proembrión después de la primera división transversal que da origen a las células apical (ca) y célula basal (cb). **C.** Proembrión (pe) de cuatro células. **D.** Desarrollo del suspensor (s) mediante divisiones transversales. **E.** Proembrión de 8 células. **F.** Embrión (e) de 16 células en donde se observa la formación del protodermo. **G.** Etapa globular temprana. **H.** Etapa globular tardía. **I.** Etapa de transición. **J.** Etapa de corazón. **K.** Etapa de torpedo. **L.** Embrión maduro. La hipófisis y sus células hijas se encuentran marcadas con azul. Modificado de West y Harada, 1993.

Establecimiento del plan vertical

La mayor parte de las angiospermas posee un plan corporal vertical, el cual se refleja en el embrión maduro a lo largo del eje basal-apical (Jeong *et al.*, 2011). Es posible seguir el origen y desarrollo de cada una de sus estructuras desde el proembrión de ocho células, en el cual se distinguen los dominios apical, central y basal. Los primeros dos se encuentran en el proembrión y son separados por el plano de división transversal. La célula más apical del suspensor, inmediatamente por debajo del proembrión, es la hipófisis, que representa el dominio basal (Fig. 2A). Parte de los cotiledones, el meristemo apical del tallo y parte del hipocótilo se originan a partir del dominio apical. El resto de los cotiledones, el hipocótilo, la radícula y parte del meristemo subapical de la raíz provienen del dominio central. Finalmente, el dominio basal da origen al centro

quiescente, las células iniciales de la caliptra y al meristemo radicular (Fig. 2B-E) (Park y Harada, 2008).

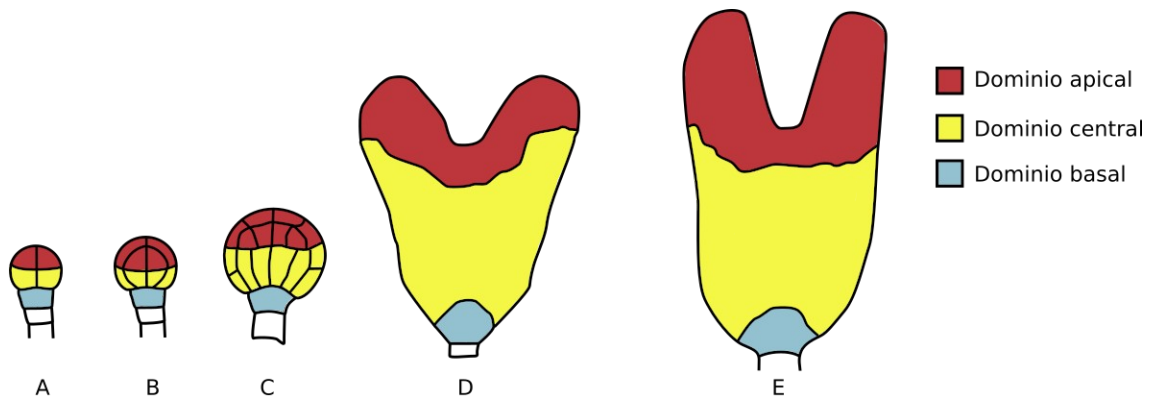


Fig. 2. Ubicación de los dominios apical, central y basal durante la embriogénesis de *A. thaliana*. **A.** Proembrión de ocho células. **B.** Dermatógeno. **C.** Etapa globular. **D.** Etapa de corazón. **E.** Etapa de torpedo. Modificado de Park y Harada, 2008.

El establecimiento de los dominios embrionarios en *A. thaliana* también es reflejado por patrones de expresión de genes de la familia *WOX*, la cual agrupa a genes relacionados con procesos de desarrollo, como la formación de patrones embrionarios, mantenimiento de células meristemáticas y formación de órganos (van der Graaff *et al.*, 2009). La expresión de los genes de esta familia está presente desde el cigoto, en donde se expresan *WOX2* y *WOX8* (Fig. 3A). Una vez que se forman las células basal y apical, la expresión de *WOX2* queda restringida a la célula apical, mientras que la célula basal expresa *WOX8* y *WOX9* (Fig. 3B). Una vez que se desarrolla el proembrión de ocho células, el dominio apical es identificado por la expresión de *WOX2*, el dominio central expresa *WOX9* y el dominio basal expresa una combinación de *WOX8* y *WOX9* (Fig. 3C) (Haecker *et al.*, 2004). Con el avance del desarrollo embrionario, el establecimiento de regiones necesarias para el mantenimiento de los meristemos apical del tallo y subapical de la raíz también depende de miembros de la familia *WOX*. Para el meristemo apical del tallo, el centro de organización es identificado por la expresión de *WUS* desde la etapa de 16 células (Fig. 3D), mientras que el meristemo subapical de la

raíz depende de la especificación del centro quiescente, la comienza con la división asimétrica de la hipófisis en la etapa globular con la expresión de WOX5 (Fig. 3E) (Radoeva *et al.*, 2019).

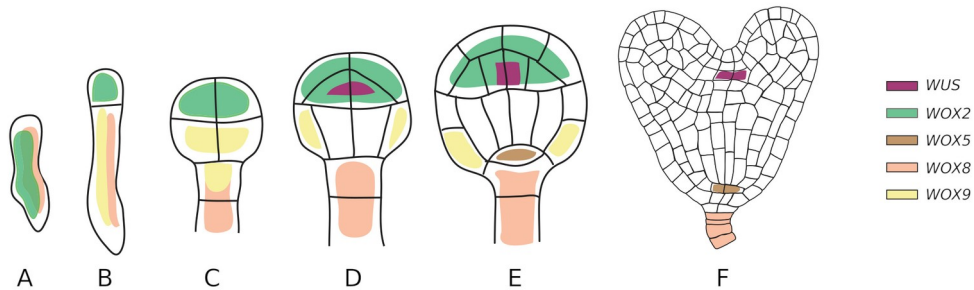


Fig. 3. Expresión de genes WOX que delimitan los dominios embrionarios en *A. thaliana*. **A.** Cigoto. **B.** Embrión de una célula **C.** Proembrión de ocho células. **D.** Embrión de 16 células. **E.** Embrión globular. **F.** Etapa de corazón. Modificado de Radoeva *et al.*, 2019.

Durante la embriogénesis de *A. thaliana* también se establece el patrón radial desde el proembrión de ocho células. A partir de la configuración de dos planos de división perpendiculares (Fig. 4A) se forma la epidermis embrionaria de modo que el proembrión cuenta con células internas rodeadas por la protodermis (Fig. 4B). El resto del desarrollo radial consiste en la formación de estratos concéntricos comenzando con la división de las células internas en el tejido fundamental y el procámbium en el embrión globular (Fig. 4C). Durante la etapa de corazón, las divisiones subsecuentes de las células del procámbium originan los primordios del tejido vascular (Fig. 4D). El desarrollo radial concluye en la etapa de torpedo con la división del meristemo fundamental en el córtex y el periciclo (Fig. 4E) (Batygina, 2006).

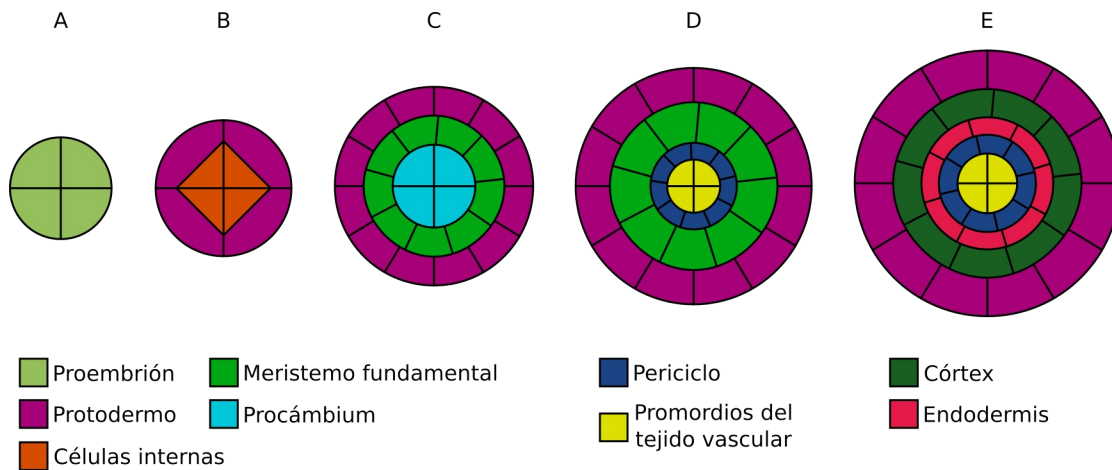


Fig. 4. Vista transversal del desarrollo radial durante la embriogénesis de *A. thaliana*. **A.** Proembrión de ocho células. **B.** Dermatogéno. **C.** Embrión globular. **D.** Etapa de corazón. **E.** Etapa de torpedo. Modificado de Batygina, 2006.

Meristemo apical del tallo

En las plantas maduras, el meristemo apical es el sitio a partir del cual surgen todas las células del tallo y las hojas. Se ubica en la porción más apical de la planta y está rodeado de primordios foliares. En la mayor parte de las angiospermas, el meristemo apical está organizado en dos regiones distinguibles por la dirección de sus divisiones celulares: la túnica y el corpus (Fig. 5A). La túnica de *A. thaliana* cuenta con dos estratos (L1 y L2), en donde ocurren divisiones anticlinales que incrementan la superficie del meristemo. El estrato por debajo de la túnica (L3) corresponde al corpus, cuyas células se dividen periclinalmente ocasionando un incremento en el número de estratos del meristemo (Raven *et al.*, 2013).

En el meristemo apical del tallo puede distinguirse también la zona central en donde se ubican las células meristemáticas. En ambos extremos de esta zona se ubica la zona periférica, en donde la tasa de división es mayor y comienza la diferenciación de los órganos laterales (Fig. 5A) (Evert *et al.*, 2006). La delimitación de la zona central depende un conjunto de células ubicadas por debajo de ella que expresan el gen *WUS* y conforman el centro de organización. El mantenimiento de la identidad meristemática

de la zona central depende de la expresión de *WUS* y a su vez la zona central lleva a cabo retroalimentación negativa hacia el centro de organización mediada por el complejo *CLV3* y *CLV1* que ocasiona la represión de *WUS* en las zonas adyacentes a las células meristemáticas, limitando su población a la zona central (Fig. 5B) (Schoof *et al.*, 2000).

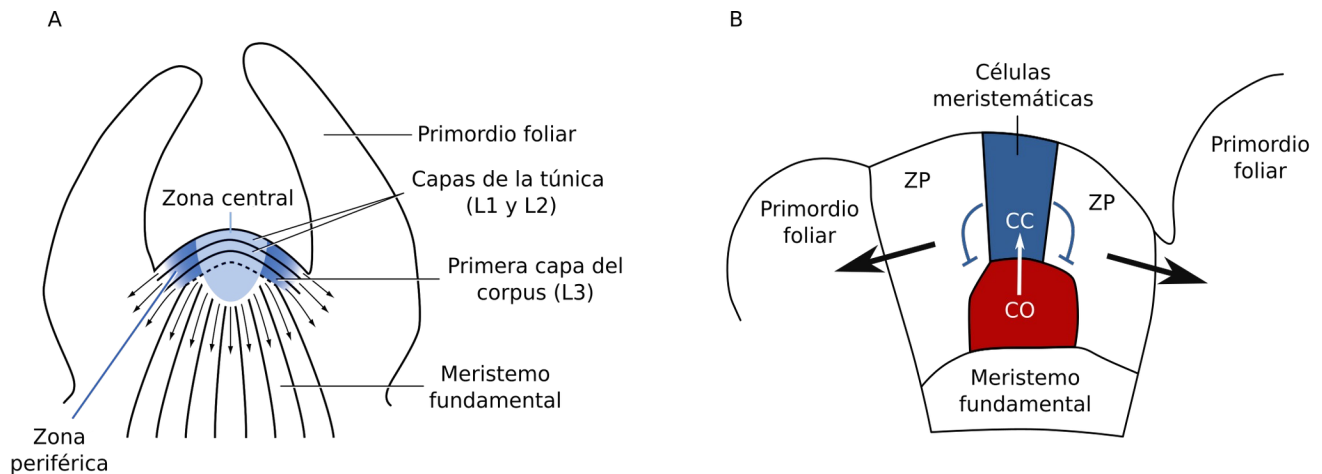


Fig. 5. A. Organización del meristemo apical. **B.** Comunicación entre el centro de organización (CO) y la zona central (CC). ZP: zona periférica. La flecha blanca indica la señalización del CO al CC. Las flechas azules truncas indican la retroalimentación negativa del CC al CO y las flechas negras indican la dirección de crecimiento de los órganos laterales. Modificado de Raven *et al.*, 2013 (A) y Schoof *et al.*, 2000 (B).

Otro gen necesario para el establecimiento del meristemo apical es *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*), el cual es necesario para el establecimiento del meristemo apical durante el desarrollo embrionario (Barton y Poethig, 1993). En *A. thaliana*, la expresión de *STM* comienza durante la etapa globular en medio de la porción apical del embrión. A partir de la etapa de corazón, la expresión de *STM* permanece en las células ubicadas entre ambos cotiledones, las cuales participan en la formación del domo del meristemo apical (Long y Barton, 1998).

Meristemo subapical de la raíz

El crecimiento continuo de las raíces depende del meristemo subapical de la raíz (Fig. 6). Se encuentra protegido por las células de la caliptra, la cual cuenta con una región central llamada columnela que es flanqueada por la caliptra lateral. Por debajo de la caliptra se ubica el promeristemo, cuyas células son pequeñas, con citoplasma denso y núcleos de gran tamaño. En esta zona se encuentran las células meristemáticas que originan a los tejidos de la raíz, de tal manera que el promeristemo cuenta con células que originan a los distintos tejidos de la configuración radial de la raíz: iniciales del córtex y de la endodermis, iniciales de la columnela e iniciales de la epidermis y de la caliptra lateral (Fig. 6). Dentro del meristemo e inmediatamente por debajo de las iniciales de la caliptra, se encuentra el centro quiescente, un conjunto de células que son mitóticamente activas al inicio del desarrollo embrionario, pero su actividad disminuye con el crecimiento de la raíz hasta permanecer casi completamente inactivas (Raven *et al.*, 2013).

El centro quiescente en *A. thaliana* consiste de cuatro células que participan en el mantenimiento de la identidad meristemática de las iniciales de los tejidos de la raíz y actúan como reservorio en caso de que alguna sea dañada (van den Berg *et al.*, 1997). El origen del centro quiescente se encuentra durante el desarrollo embrionario, en particular a la primera división transversal de la hipófisis durante la etapa globular, de la cual surgen una célula apical en forma de lente que da origen al centro quiescente y una célula basal que da origen a la caliptra (Jeong *et al.*, 2011).

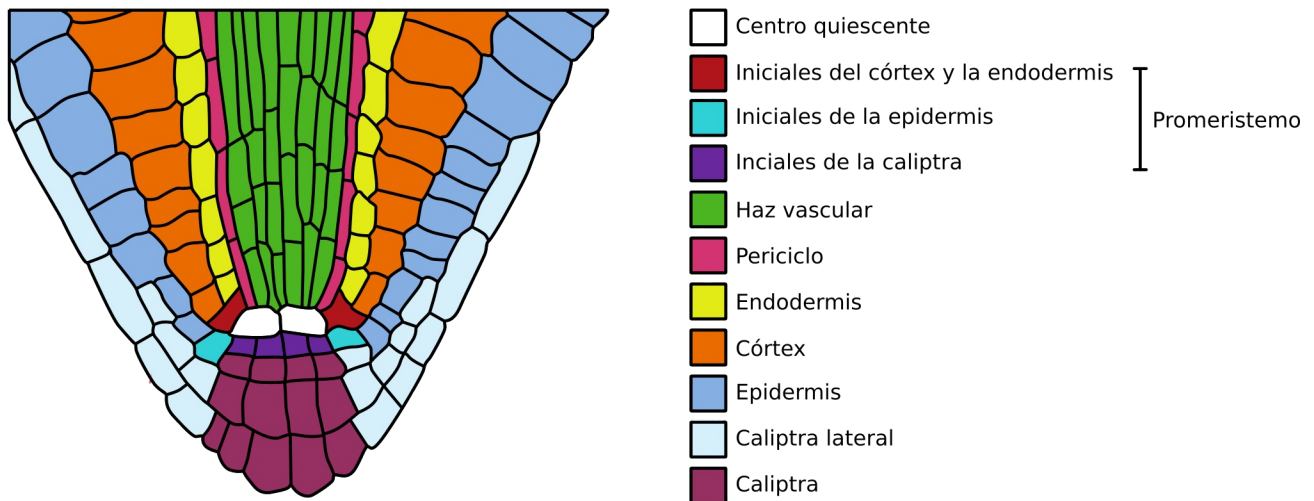


Fig. 6. Organización del meristemo subapical de la raíz en *A. thaliana*. Modificado de Song *et al.*, 2008

Desarrollo de la cubierta seminal

La cubierta seminal se deriva de los tejidos del óvulo, el tegumento externo da origen a la testa mientras que el tegmen se desarrolla a partir del tegumento interno. La cubierta rodea al embrión y le brinda protección, además de que mantiene su estado latente.

Las semillas de *A. thaliana* son mixospérmicas, es decir producen mucílago en el estrato más externo, el cual es liberado al inicio de la germinación (imbibición). Su cubierta seminal está conformada por cinco estratos celulares, dos de los cuales pertenecen a la testa (oi1 y oi2) y las tres restantes pertenecen al tegmen (ii1, ii1' e ii2) (Fig. 7) (Haughn y Western, 2012).

El desarrollo de la testa se caracteriza por la acumulación de mucílago que ocurre en el estrato más externo (oi2) y el engrosamiento de la pared periclinal interna (oi1) antes de su compresión. Al inicio del desarrollo, ambos estratos presentan una vacuola que ocupa la mayor parte del espacio celular (Fig. 7A-B). En la etapa globular (Fig. 7C), la vacuola disminuye de tamaño y comienza la acumulación de granos de almidón. Durante la etapa de torpedo (Fig. 7D), el citoplasma comienza a restringirse en oi2 debido a la acumulación de mucílago. Una vez que ha terminado la síntesis de mucílago

(Fig. 7E), el citoplasma queda organizado en una columna en el centro de la célula y posteriormente ésta sintetiza una pared secundaria que se une con las paredes primarias formando la columnela (Fig. 7F) (Western *et al.*, 2000).

Los estratos del tegmen (ii1' e ii2) permanecen vacuolados durante todo el desarrollo embrionario y una vez que ha madurado el embrión se encuentran comprimidos y contribuyen a la pigmentación café de la semilla junto con oi1 (Fig. 7F).

El endotelio (ii1) es el estrato más interno del tegmen, en donde se acumulan antocianinas durante el desarrollo (Debeaujon *et al.*, 2003), las cuales se restringen a los márgenes de la célula debido a la presencia de la vacuola (Fig. 7B-E). En la semilla madura, las células del endotelio están muertas o comprimidas (Fig. 7F) (Beeckman *et al.*, 2000).

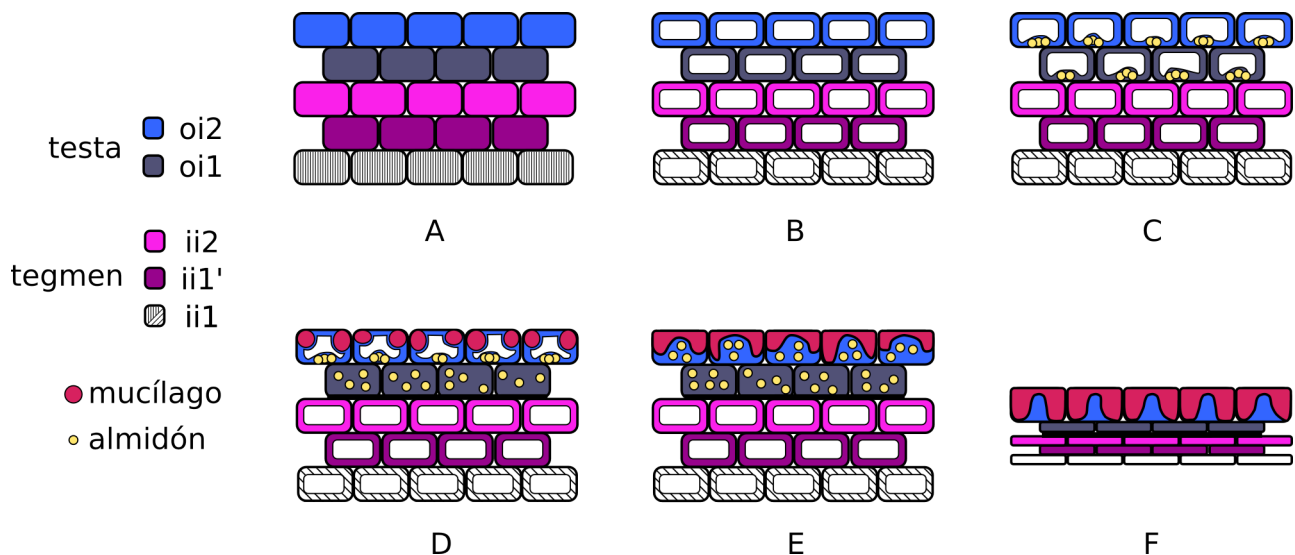


Fig. 7. Desarrollo de la cubierta seminal de *A. thaliana*. **A.** Tegmentos antes de la fertilización. **B.** Proembrión de una célula. **C.** Embrión globular. **D.** Etapa de torpedo. **E.** Embrión maduro. **F.** Semilla Madura. Tomado de Beeckman *et al.*, 2000.

Familia Podostemaceae

La familia Podostemaceae agrupa alrededor de 280 especies de plantas acuáticas que habitan en cascadas y rápidos. Sus taxa están restringidos a pequeñas áreas geográficas; sin embargo, la familia se distribuye globalmente a lo largo de los trópicos y subtrópicos. Su ciclo de vida puede ser anual o perenne y comienza con la germinación al inicio de la época de lluvias mientras que la floración ocurre con el descenso del nivel del agua (Cook y Rutishauser, 2007a).

La familia cuenta con tres subfamilias Podostemoideae, Weddellinoideae y Tristichoideae, cuya delimitación está soportada por el análisis filogenético realizado con el marcador *matK*, el cual ubica a Tristichoideae como el grupo tempranamente divergente, siendo a su vez el grupo hermano del clado formado por Weddellinoideae y Podostemoideae (Kita y Kato, 2001). El origen de la familia aún es incierto, ya que se han propuesto dos escenarios contradictorios. Por una parte, el origen podría haber ocurrido en América, con el ancestro común de Podostemoideae y Weddellinoideae, mientras que Tristichoideae sería un grupo derivado que llegó a Asia y África por dispersión a larga distancia. El escenario alternativo establece que la familia se originó en Asia, en donde permaneció Tristichoideae mientras que el ancestro común de Weddellinoideae y Podostemoideae migró hacia América (Koi *et al.*, 2015).

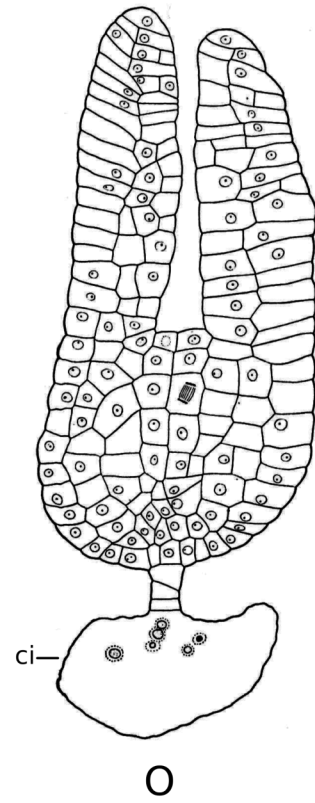
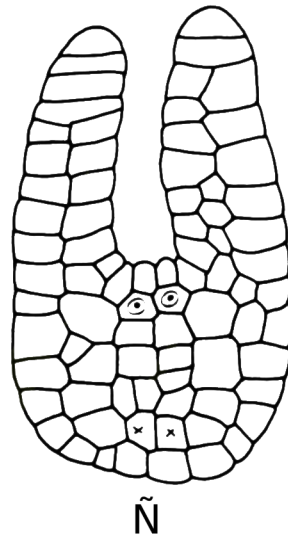
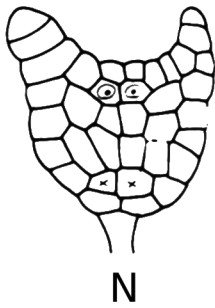
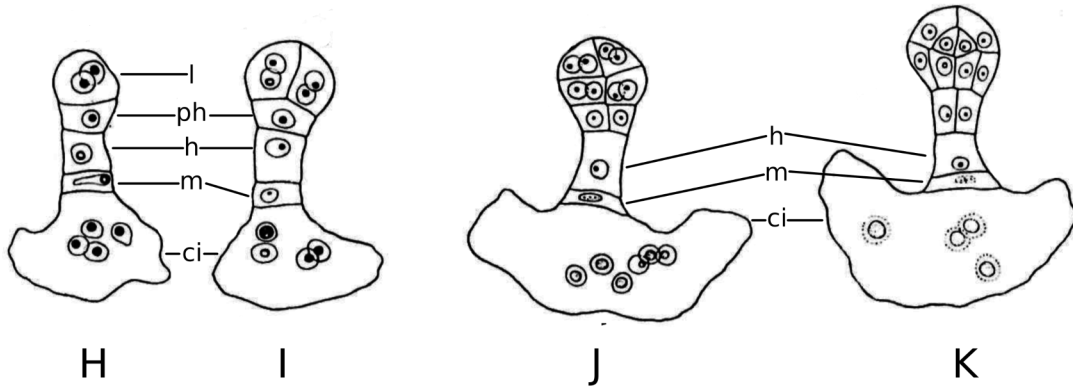
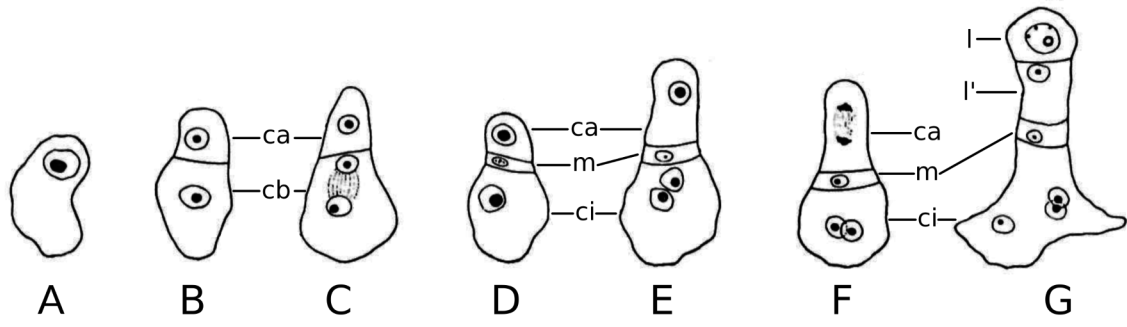
Desarrollo embrionario de Podostemaceae

El saco embrionario está conformado por cuatro células: una ovocélula, dos sinérgidas y la célula central. Debido a que la célula central degenera antes de la fecundación no hay formación de endospermo. El plasmodio nucelar ha sido propuesto como una estructura que cumple con el aporte de nutrientes al saco embrionario y al embrión en desarrollo. Esta estructura se forma a partir de las células de la nucela, las cuales pierden sus paredes transversales y sus contenidos se vuelven inconspicuos (Jäger-Zürn, 1997).

Los estudios embrionarios de Podostemaceae se han enfocado en especies asiáticas, particularmente de India (Razi, 1949; Mukkada, 1969; Mukkada y Chopra, 1973; Nagendran *et al.*, 1981; Katayama *et al.*, 2011). Algunos trabajos se enfocaron en el desarrollo del saco embrionario (Razi, 1949; Mukkada, 1969), mientras que otros describieron también las etapas de la embriogénesis (Nagendran *et al.*, 1981; Katayama *et al.*, 2011) y las características de la cubierta seminal (Mukkada y Chopra, 1973). De estos trabajos, la descripción más completa corresponde al desarrollo embrionario de *Indotristicha ramossisima* (Tristichoideae) (Mukkada y Chopra, 1973; Nagendran *et al.*, 1981), por lo cual se usará para describir el patrón general de la familia.

El cigoto de *I. ramossisima* se divide transversalmente, dando origen a la célula apical (ca) y la célula basal (cb) (Fig. 8A-B). El desarrollo embrionario comienza con la formación del suspensor (Fig. 8A-H), con la contribución de células descendientes tanto de ca como de cb. La primera división en el proembrión de una célula ocurre en cb, la cual se divide transversalmente dando origen a dos células, de las cuales la más basal aumenta de tamaño y forma un haustorio cenocítico (ci) mediante divisiones nucleares libres, mientras que la célula comprendida entre ci y ca es denominada m (Fig. 8D-E). La siguiente división ocurre en la célula apical de manera transversal lo cual da origen a l y l' (Fig. 8G), la cual es seguida por una segunda división transversal en l' de la cual resultan ph y h y concluye el desarrollo del suspensor (Fig. 8H). Dos divisiones longitudinales perpendiculares en el proembrión (l) dan origen al proembrión de 4 células (Fig. 8H-I) y una división transversal subsecuente forma al proembrión de 8 células (Fig. 8J). Durante esta misma etapa ocurre la división longitudinal de la hipófisis (ph). Posteriormente, cada una de las células del proembrión se divide anticlinalmente, formando el embrión de 16 células (Fig. 8K) (Mukkada y Chopra, 1973).

▼ **Fig. 8.** Desarrollo embrionario de *I. ramossisima*. **A.** Cigoto. **B-H.** Proembrión de una célula. **I.** Proembrión de cuatro células. **J.** Proembrión de ocho células. **K.** Embrión de 16 células. **L.** Embrión globular. **M-N.** Etapa de corazón. **Ñ.** Etapa de torpedo temprana. **O.** Etapa de torpedo tardía. ca: célula apical, cb: célula basal, ci: haustorio, l: proembrión, ph: hipófisis. Modificado de Mukkada, 1969 y Nagendran *et al.*, 1981.



El embrión globular (Fig. 8L) surge por divisiones anticlinales de las células del protodermis y divisiones longitudinales del núcleo axial, el conjunto de células rodeadas por el protodermis, excluyendo al meristemo apical y la hipófisis.

La etapa de corazón (Fig. 8M) se origina por divisiones longitudinales de las células del núcleo axial, formando así el córtex primario. Las iniciales de los cotiledones se forman a través de la división transversal de células apicales del protodermis en extremos opuestos (Fig. 8M), los cuales se alargan mediante divisiones transversales (Fig. 8N). En la etapa de torpedo temprana (Fig. 8Ñ), ambos cotiledones aumentan de grosor mediante divisiones longitudinales de las células ubicadas en la base, mientras sus extremos apicales permanecen con el ancho de una célula (Nagendran *et al.*, 1981). En la etapa de torpedo tardía (Fig. 8O), el suspensor y su haustorio se encuentran aún presentes, pero degeneran una vez que el embrión ha madurado. En el embrión maduro, tanto los cotiledones como el hipocótilo cuentan con granos de almidón que solamente están ausentes en la región del meristemo apical (Mukkada, 1969).

Respecto a la cubierta seminal, el tegumento interno usualmente está conformado por dos estratos, mientras que el tegumento externo cuenta con dos a tres estratos (Fig. 9A) (Mukkada, 1969). Antes de la formación del saco embrionario, el tegumento externo contiene granos de almidón, los cuales son más abundantes en el estrato más externa. Una vez que el saco embrionario ha madurado, el tegumento externo también cuenta con granos de almidón y el estrato más externa del tegumento externo acumula taninos. Cuando el proembrión presenta una sola célula y el suspensor está en desarrollo (Fig. 9B), las paredes celulares del tegumento interno se engrosan y con el avance del desarrollo los estratos internos son comprimidos (Fig. 9C) como resultado del crecimiento del embrión. Por otra parte, el estrato más externo del tegumento externo pierde los taninos y acumula mucílago en la pared periclinal externa (Mukkada y Chopra, 1973).

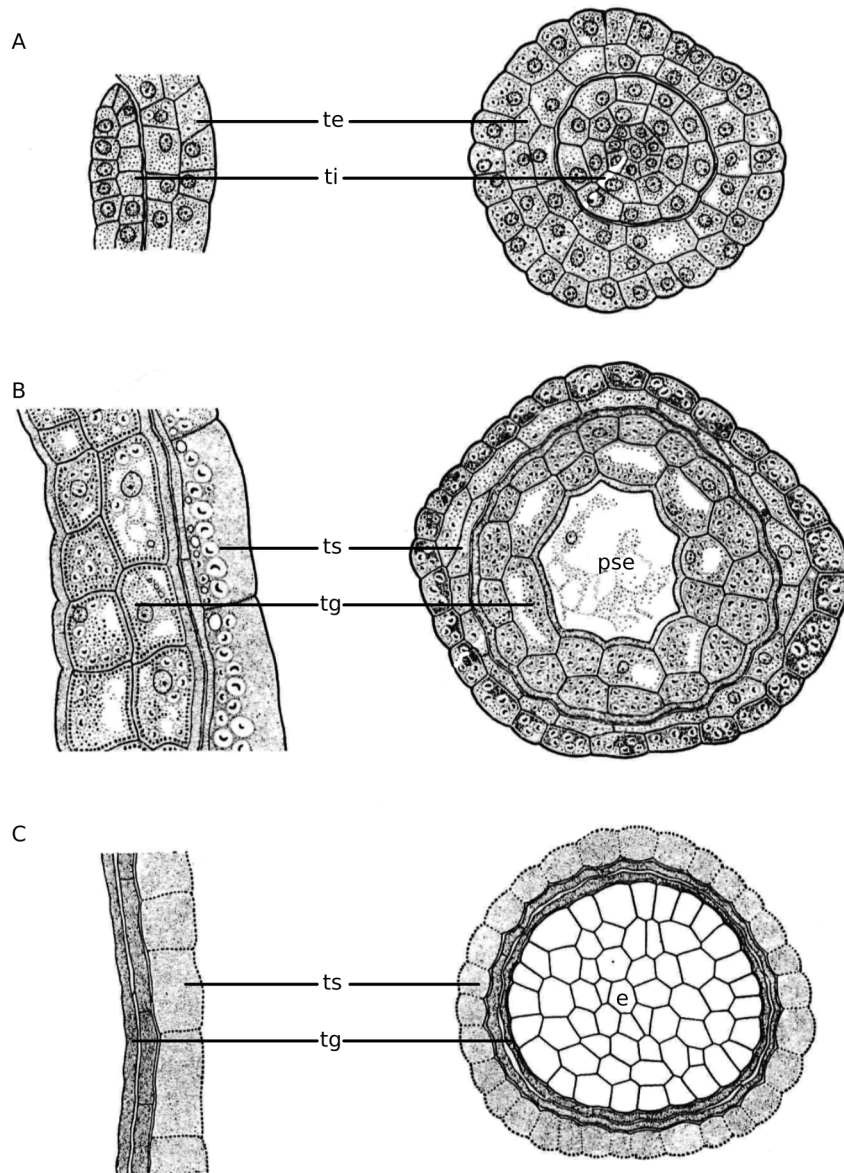


Fig. 9. Vistas longitudinal y transversal del desarrollo de la cubierta seminal en *I. ramossisima*. A. tegumentos externo (te) e interno (ti) en el ovario maduro. B. Testa (ts) y tegmen (tg) en el proembrión de una célula con el pseudosaco embrionario (pse) en el centro. C. Testa y tegmen en el embrión maduro (e). Modificado de Mukkada y Chopra, 1973.

Antecedentes

Modificación del plan corporal en Podostemaceae

A diferencia de la mayoría de las angiospermas, los miembros de Podostemaceae cuentan con un plan corporal horizontal. Las plantas adultas poseen un cuerpo fotosintético aplanado que crece adherido a las rocas mediante pelos que secretan mucílago y cuyo crecimiento es guiado por raíces adventicias (Cook y Rutishauser, 2007).

Este plan corporal cuenta con modificaciones adicionales que son propias de cada subfamilia. Por ejemplo, en la subfamilia Podostemoideae pueden encontrarse distintas morfologías de la raíz (costrosa, foliar, subcilíndrica), origen de las raíces adventicias (endógeno o exógeno), además de la presencia o ausencia de hojas plumulares entre los cotiledones (Katayama *et al.*, 2011). Algunas de estas características son evidencia de evolución saltacional debido a que representan cambios drásticos en el plan corporal, como la desaparición de radícula, pérdida de la plúmula, origen exógeno de las raíces y pérdida de raíces adventicias originadas a partir del hipocótilo (Koi y Kato, 2010a, 2010b).

Debido a que el grupo hermano de Podostemaceae es la familia Hypericaceae, un grupo de plantas terrestres con plan corporal vertical que agrupa arbustos, árboles y plantas herbáceas con desarrollo comparable al resto de angiospermas (Stevens, 2007), Podostemaceae debió adquirir las modificaciones al plan corporal requeridas por la vida sumergida en los ríos a partir del hábito terrestre de Hypericaceae. La rápida aparición de estos caracteres ha sido explicada debido a un incremento en la tasa de mutación durante el surgimiento de la familia y de nuevo durante la diferenciación de Podostemoideae. Estos incrementos podrían haberse presentado como resultado de la transición del hábitat terrestre a los ríos, los cuales están constantemente expuestos a la luz del sol y a radiación ultravioleta, con lo cual se presentó un mayor número de

mutaciones debido al daño que este tipo de radiación ocasiona en el DNA (Katayama *et al.*, 2022).

Dentro de las variaciones en la anatomía de las plántulas de Podostemaceae destaca la ausencia de raíz primaria en Podostemoideae y Weddellinoideae, así como la reducción del meristemo apical en Podostemoideae y, dentro de esta subfamilia, la desaparición del meristemo apical en el clado *Hydrobryum*. En este contexto, Tristichoideae cuenta con estados de carácter plesiomórficos, que son la presencia de raíz primaria y un meristemo apical con organización túnica-carpus, los cuales son comparables a las estructuras presentes en el resto de las angiospermas (Katayama *et al.*, 2011).

Establecimiento del plan corporal vertical y modificaciones en el desarrollo embrionario de Podostemaceae

Cambios observados durante el desarrollo embrionario de la subfamilia Podostemoideae indican que la pérdida de la raíz y las modificaciones del meristemo apical se deben al cambio en el patrón de las divisiones a partir de la etapa de 8 células, después del establecimiento de los dominios embrionarios. *Terniopsis brevis* (Tristichoideae) (Fig. 10B) cuenta con un meristemo apical comparable al resto de las angiospermas al igual que una raíz, lo cual implica la organización túnica-carpus y la presencia de las células precursoras del centro quiescente. Si bien las estructuras propias de los meristemos primarios se encuentran presentes, algunas características son notables comparadas con el desarrollo de *A. thaliana* (Fig. 10A), como el hecho de que la túnica de *T. brevis* presenta únicamente un estrato y las células precursoras del centro quiescente se originan mediante una primera división longitudinal y una segunda transversal (Katayama *et al.*, 2011).

La organización del centro quiescente se pierde en *Zeylanidium lichenoides* e *Hydrobryum japonicum* (Fig. 10C y D), ambas pertenecientes a Podostemoideae, debido a la división temprana de la hipófisis durante la etapa de 8 células, seguida de una

división longitudinal y subsecuentes divisiones en distintas direcciones de las células hijas de la hipófisis. Como resultado, no es posible distinguir al par de células precursoras del centro quiescente (Katayama *et al.*, 2011).

Por otra parte, *Z. lichenoides* (Fig. 10C) no cuenta con estratos de la túnica entre ambos cotiledones debido a que no se forman las células precursoras del estrato L1. Ello se debe a la pérdida de una segunda división anticlinal en las células protodérmicas más centrales durante la transición al embrión globular. Debido a esto, las células más externas que conectan a ambos cotiledones son parte de la epidermis y carecen de identidad meristemática. Debajo de ellas se encuentran las células precursoras del centro de organización, las cuales son descendientes de las células del dominio apical (Katayama *et al.*, 2011).

Debido a que *T. brevis* expresa *STM* de manera similar a *A. thaliana*, otros miembros de Podostemaceae podrían mantener este y otros patrones de expresión que permitan usar a *STM* como un marcador de células meristemáticas (Katayama *et al.*, 2010).

Las células precursoras del centro de organización en *Z. lichenoides* son morfológicamente indistinguibles de las células circundantes, pero su identidad meristemática ha sido reconocida por la expresión de *ZISTM* (homólogo de *STM*). Esta expresión desaparece poco después de la germinación, lo cual concuerda con la identidad transitoria del centro de organización y del meristemo apical (Katayama *et al.*, 2013).

Finalmente, *H. japonicum* (Fig. 10D) presenta una reducción aún mayor del meristemo apical, debido a que las células del dominio apical no se dividen periclinalmente durante la transición al embrión de 16 células, por lo que sus descendientes quedan expuestas al medio extraembrionario y se diferencian en células epidérmicas sin la formación de L1 ni células precursoras del centro de organización (Katayama *et al.*, 2011).

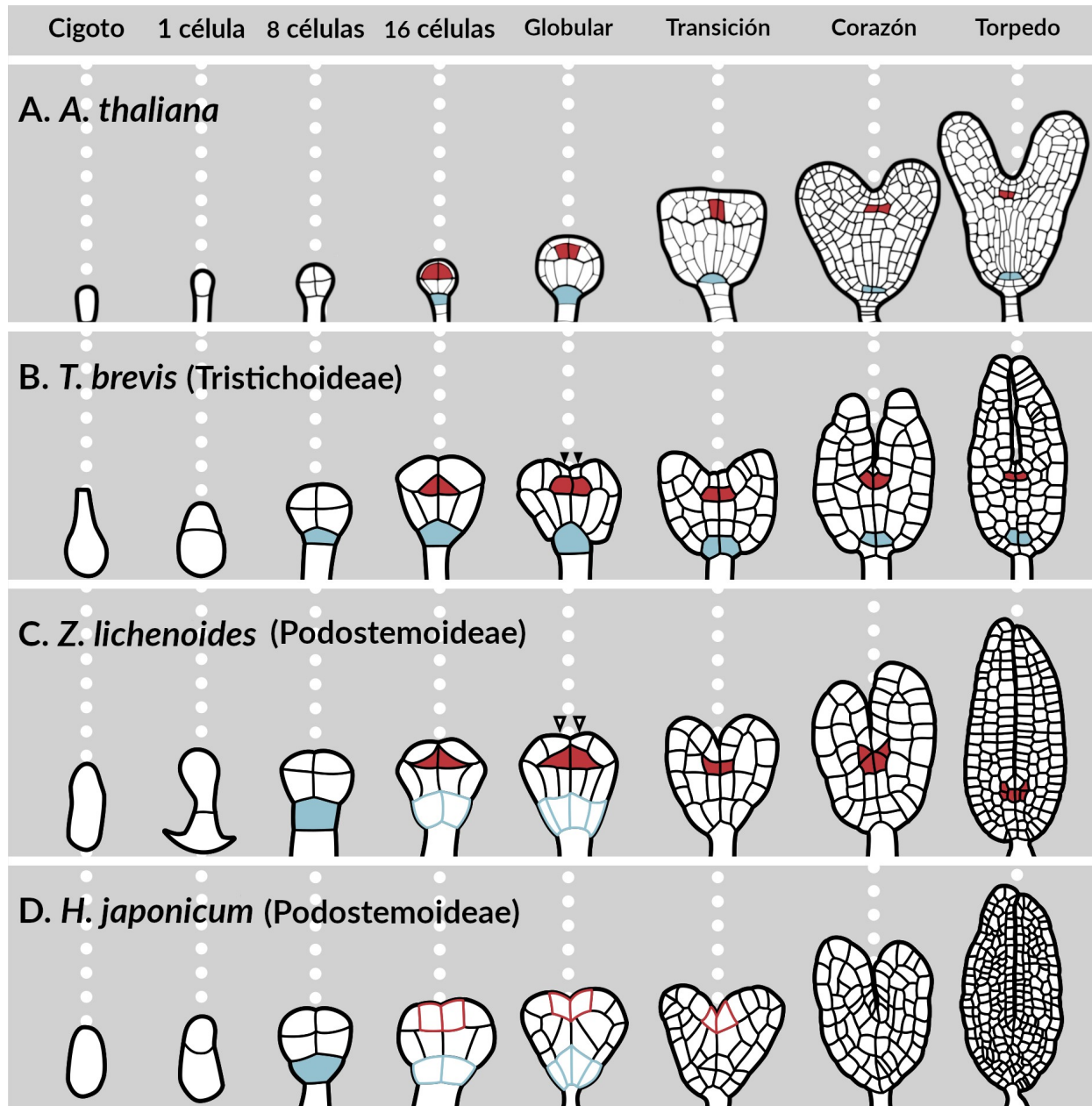


Fig. 10. Comparación del desarrollo embrionario. **A.** *A. thaliana*. **B.** *T. brevis*. **C.** *Z. lichenoides*. **D.** *H. japonicum*. Las células precursoras del centro de organización se encuentran marcadas en rojo. En color azul están señaladas las células de la hipófisis y sus descendientes. Los contornos rojos y azules indican cambios en la dirección de las divisiones que resultan en la modificación del meristemo apical y radicular, respectivamente. Las cabezas de flecha señalan las células precursoras de la capa L1. Las cabezas de flecha contorneadas indican la ausencia de las células precursoras de L1. Modificado de Katayama *et al.*, 2011

En este trabajo se busca describir el desarrollo de la semilla de *Marathrum foeniculaceum* (Podostemoideae) para contribuir al limitado conocimiento que se tiene de especies con distribución en México. Se contempla el desarrollo del embrión y de la cubierta seminal para compararlos con los patrones observados en otros miembros de Podostemaceae, particularmente respecto a las descripciones de miembros asiáticos de Podostemoideae que explican la pérdida de los meristemas primarios.

Objetivos

Objetivo general

Conocer el desarrollo de la semilla de *Marathrum foeniculaceum*.

Objetivos particulares

- Describir el desarrollo embrionario de *M. foeniculaceum*.
- Describir el desarrollo de la cubierta seminal de *M. foeniculaceum*.
- Identificar los tipos de reservas presentes en las semillas de *M. foeniculaceum*.
- Comparar el patrón de desarrollo embrionario de *M. foeniculaceum* con el de otras dicotiledóneas y otras especies de la subfamilia Podostemoideae.

Materiales y método

Especie de estudio

M. foeniculaceum es una planta acuática anual, la germinación y el crecimiento vegetativo ocurre durante la época de lluvias (junio a octubre), mientras que la floración se presenta durante la época de secas (noviembre a finales de enero) (Jiménez-Durán *et al.*, 2021).

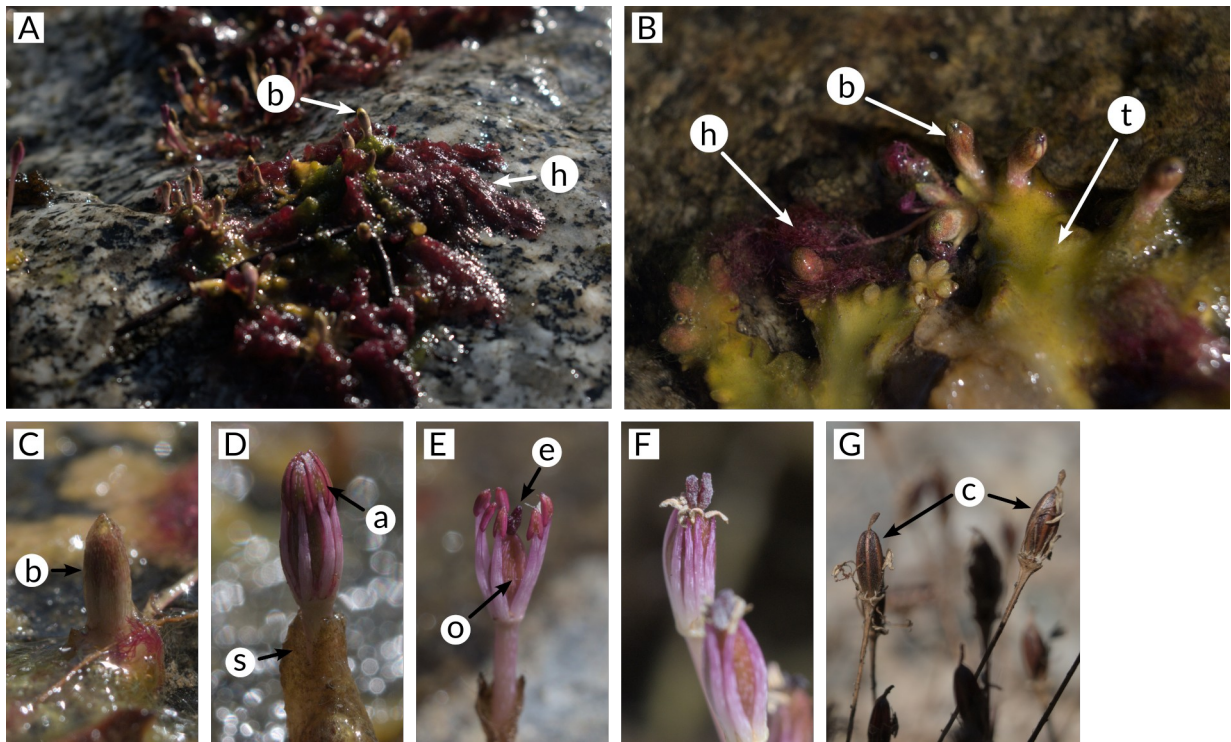


Fig. 11. *M. foeniculaceum*. **A.** Tallo sobre una roca con botones (b) y hojas (h). **B.** Acercamiento al tallo (t) con botones y hojas en los márgenes. **C.** Acercamiento a un botón. **D.** Flor en preantesis fuera de la espátula (s). Las anteras (a) están pegadas al ovario. **E.** Flor en antesis, las anteras están separadas del ovario (o) y se observa el estigma (e). **F.** Flores en postantesis. **G.** Cápsulas (c).

Se adhiere a las rocas mediante tallos aplanados con forma de disco (Fig 11A y B). Las hojas se originan de los márgenes del tallo y de la superficie ventral (Rutishauser *et al.*, 1999). Las hojas son pecioladas, y repetidamente pinnadas con las pinas primarias alternadas a lo largo del raquis central. Las flores son actinomorfas, con 6-11 tépalos

rosas y 5 -11 estambres alrededor del ovario (Fig. 11C-E) (Novelo *et al.*, 2009). El ovario es súpero, elipsoide, bilocular y con un estigma bilobado (Fig. 11E-F), su tamaño no incrementa durante el desarrollo de la cápsula, la cual forma 6 costillas cuando está madura (Fig. 11G) (Rutishauser *et al.*, 1999).

Material biológico

Flores en antesis, post antesis y frutos en diferentes etapas de desarrollo se colectaron en el río Las Juntas, Cabo Corrientes, Jalisco en enero de 2020. El río es oligotrófico (Quiroz *et al.*, 1997), en donde las temperaturas durante primavera y verano oscilan entre 25-30 °C (Reyes-Ortega *et al.*, 2009) con abundantes rocas de granito donde suelen adherirse las podostemáceas (Philbrick y Novelo, 1994). El material biológico se fijó en FAA (formaldehído, alcohol, ácido acético y agua 10%:50%:5%, 35%).

Las flores en post antesis y los frutos fueron divididos en cuatro etapas. Posterior a la antesis, la presencia de las anteras no fue tomada en cuenta debido a su posible remoción durante el procesamiento del material. Debido a que el tamaño del ovario no incrementa durante la formación del fruto, las últimas dos etapas fueron distinguidas de acuerdo con la coloración y con la pérdida de la superficie lisa del ovario como resultado de la formación de costillas longitudinales que resultan de la reducción de tejido parenquimatoso (Rutishauser *et al.*, 1999). La coloración del ovario en las etapas 1-4 fue variable, siendo clara u oscura en distintas etapas sin un patrón distinguible.

- Etapa 1: Las anteras se encuentran dehiscentes, el ápice de los estigmas presenta oscurecimiento en los ápices.
- Etapa 2: El oscurecimiento de los estigmas se extiende hacia la base
- Etapa 3: La coloración del fruto es café oscuro-rojizo, comienzan a ser evidentes las protuberancias que formarán las costillas.
- Etapa 4. La presencia de costillas es evidente.

La pared del ovario y del fruto fueron retiradas después de realizar un corte longitudinal para extraer los ovarios y las semillas, las cuales fueron desprendidas de la región axilar de la placenta.

Procesamiento histológico

Las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de etanol: 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%. Se realizaron tres cambios de 24 horas en alcohol absoluto, mientras que las muestras permanecieron 2 horas en el resto de las soluciones (Márquez-Guzmán *et al.*, 2016).

La inclusión fue realizada en LR White, inicialmente en proporción 1:1 con etanol al 100% durante 3 horas. Subsecuentemente se realizaron 3 cambios en LR White puro durante 12 horas. La polimerización se realizó a 60 °C durante 24 horas (Márquez-Guzmán *et al.*, 2016).

Se realizaron cortes longitudinales semifinos (1 - 3µm) de óvulos y semillas en un ultramicrotomo PT-X Power Tome, RMC Products empleando una cuchilla de vidrio con barquilla de agua (Katayama *et al.*, 2011). Los cortes fueron recuperados con un asa de cobre, colocados en portaobjetos y secados sobre una estufa eléctrica (Márquez-Guzmán *et al.*, 2016). Los cortes obtenidos fueron empleados para la realización de pruebas histoquímicas y tinción con azul de toluidina al 0.5%. Una vez teñidos, se tomaron fotomicrografías con un microscopio óptico Olympus BX51.

Pruebas histoquímicas

Para evaluar la presencia de almidón, los cortes fueron cubiertos con lugol durante 10 minutos. Posteriormente se retiró el exceso con agua y fueron observados después de colocar un portaobjetos (Márquez-Guzmán *et al.*, 2016).

La presencia de proteínas se determinó aplicando azul negro de naftol al 1% en ácido acético al 7% a los cortes durante 10 minutos. El exceso fue retirado con ácido

acético al 7%. Las preparaciones fueron cubiertas con la misma solución durante 5 minutos y finalmente se lavaron con agua (Mazzoni-Viveiros y Castro, 2016).

Microscopía electrónica de barrido

Para observar a detalle la superficie de la cubierta intacta así como después de la liberación de mucílago se emplearon semillas maduras sin ningún tratamiento, así como semillas expuestas a agua y cuyo mucílago fue removido manualmente después de ser liberado. En ambos casos, las semillas fueron secadas mediante la técnica de punto crítico y cubiertas con oro para su observación (Nebesářová, 2019).

Resultados

Desarrollo del proembrión y del suspensor

La primera división del cigoto ocurre de manera transversal (Fig. 12A), dando origen a la célula basal (cb) en el extremo micropilar, la cual es de mayor tamaño respecto a la célula apical (ca). El desarrollo embrionario continúa con la formación del suspensor a través de una serie de divisiones transversales en las que participan la célula basal y la célula apical. La primera división ocurre en la célula basal y forma el suspensor de dos células que consiste de un haustorio micropilar (ci) y una célula de menor tamaño (m) por encima del haustorio (Fig. 12B); ambas permanecen sin dividirse a lo largo del desarrollo. En esta etapa también se observa la elongación de la ca. Al suspensor de tres células (Fig. 12C), se añaden l y l' a través de la división transversal de la ca. En esta etapa, ci se encuentra vacuolada y se observan pequeñas expansiones del citoplasma hacia los tejidos laterales del micrópilo. El desarrollo del suspensor termina con la elongación de l' (Fig. 12D) y su posterior división, la cual forma a ph y h, (Fig. 12E), de las cuales ph corresponde a la hipófisis al ser la más apical por debajo de l, que corresponde al proembrión, mientras que h es la célula por debajo de la hipófisis.

Una vez concluida la formación del suspensor, comienza el desarrollo del proembrión con una división longitudinal de l, y una segunda división longitudinal perpendicular a la primera, las cuales forman al proembrión de cuatro células (Fig. 12F). La siguiente etapa se caracteriza por la segmentación vertical del proembrión, debido a que se forman dos regiones externas (Figs. 12G, I y J) y una interna (Fig. 12H). Las regiones externas presentan la misma organización debido a que cuentan con dos planos de división longitudinales que dividen al embrión en tres secciones verticales, mientras que la región interna presenta solamente un plano longitudinal. Las tres regiones son atravesadas por un plano de división transversal, de modo que el

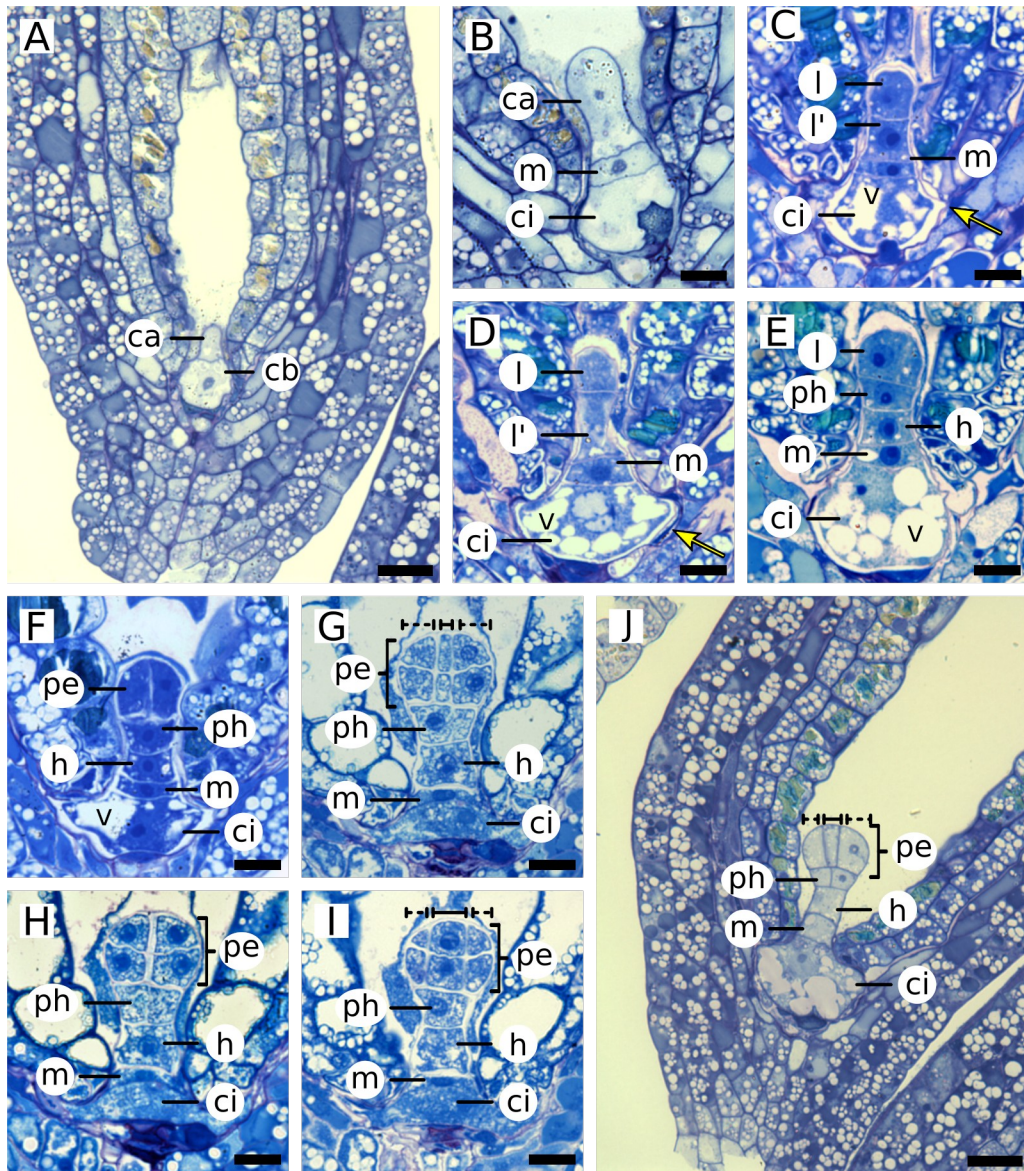


Fig. 12. Desarrollo del proembrión de *M. foeniculaceum*. **A.** Proembrión después de la división transversal del cigoto. **B.** Proembrión de una célula con suspensor de dos células. **C.** Proembrión de una célula con suspensor de tres células. **D.** Misma etapa que en **C** mostrando elongación de l' antes a su división transversal. **E.** Proembrión de una célula con suspensor de cuatro células. **F.** Proembrión de cuatro células. **G-I.** Proembrión de 16 células. **G.** Región externa cercana al centro del proembrión. **H.** Región central del proembrión. **I.** Región externa distante al centro del proembrión. **J.** Dermatogeno. ca: célula apical, c: cotiledones, cb: célula basal, ci: haustorio micropilar, pe: proembrión, ph: hipófisis, v: vacuola. Las flechas indican la expansión horizontal de ci. Las barras sólidas señalan el ancho de la sección central y las barras punteadas señalan el ancho de las secciones laterales. Escalas: 20 μm (A, y J), 10 μm (B-I).

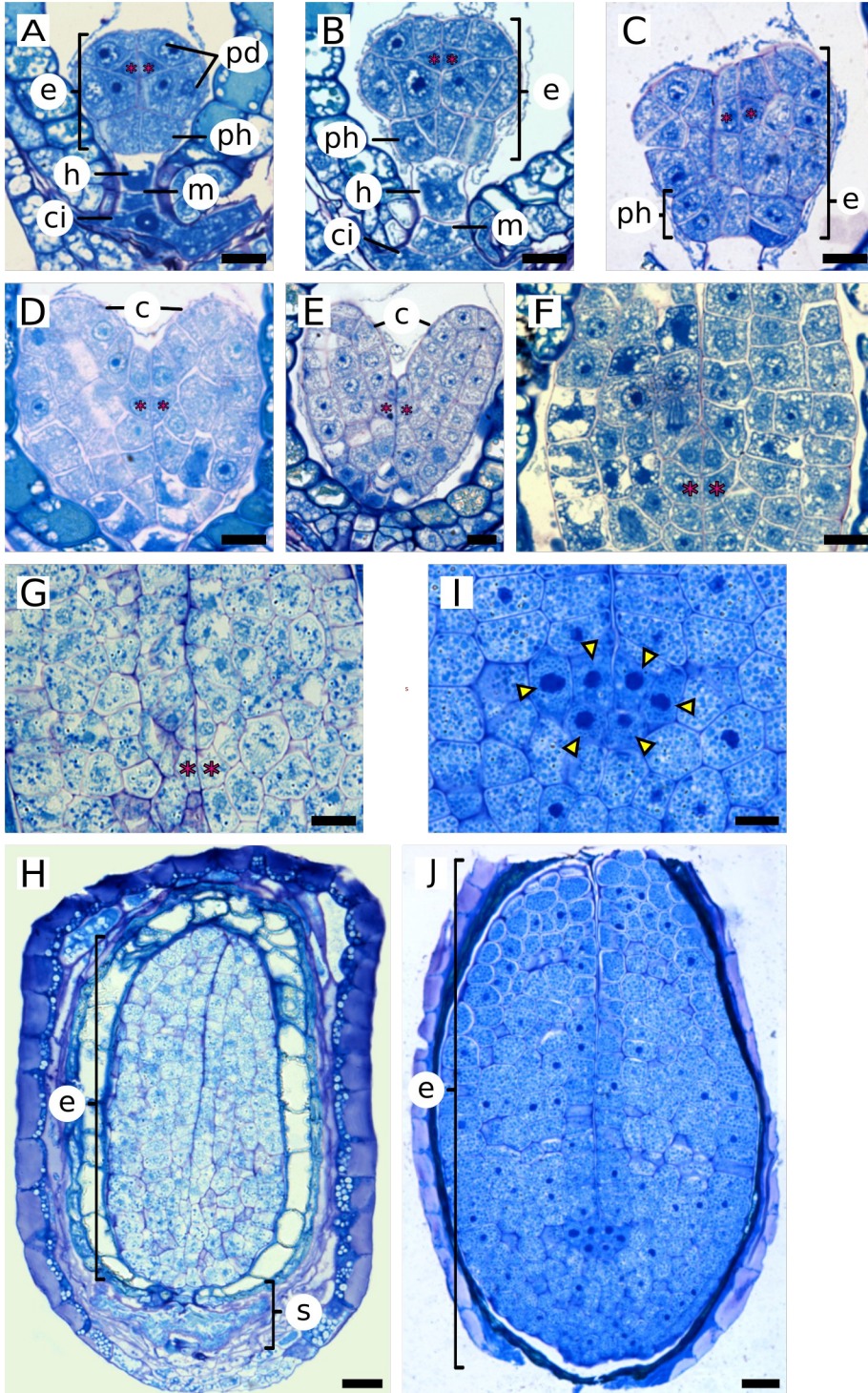
proembrión tiene un total de 16 células, 6 en cada una de las regiones externas y 4 en la región interna (Fig. 12G-I).

Las secciones verticales en las regiones externas se establecen antes de que ocurra la división transversal (Fig. 12J) y su ancho varía de acuerdo con la distancia respecto al centro del embrión. En las porciones más cercanas hacia el interior del embrión, la sección central es más estrecha (Fig. 12G), y mientras más cerca de la periferia la sección central se ensancha (Fig. 12I).

Desarrollo del embrión

La embriogénesis continúa con la formación de la protodermis (Fig. 13A), con lo cual termina el desarrollo del proembrión. Debido a las diferencias en la organización de las regiones externas del proembrión de 16 células (Fig. 12G-I), esta descripción únicamente refleja las divisiones ocurridas en las células de la región central (Fig. 12H), más no necesariamente en las regiones externas. La protodermis se origina a través de divisiones periclinales en cada una de las cuatro células de la región central. En esta etapa es posible identificar a las células más apicales por debajo de la protodermis como las precursoras del centro de organización (Fig. 13A). En esta etapa, la hipófisis se ha dividido longitudinalmente y el haustorio micropilar continúa con su expansión horizontal en los tejidos del micrópilo. En la etapa globular (Fig. 13B), las células de la protodermis se dividen anticlinalmente y las células hijas de la hipófisis se dividen longitudinalmente dando origen a cuatro células en el extremo basal del embrión.

▼ **Fig. 13.** Desarrollo del embrión de *M. foeniculaceum*. **A.** Dermatógono. **B.** Etapa globular temprana. **C.** Etapa de transición. **D.** Etapa de corazón con los cotiledones (c) emergentes. **E.** Etapa de corazón tardía. **F.** Espacio entre los cotiledones de la etapa de torpedo. **G.** Espacio entre los cotiledones en el embrión casi maduro. **H.** Semilla en la misma etapa que en G con el suspensor (s) aún presente. **I.** Espacio entre los cotiledones en la semilla madura. **J.** Embrión en la misma etapa que en I, e: embrión, ph: hipófisis, pd: protodermis, . Los asteriscos señalan las células precursoras del centro de organización. Las cabezas de flecha indican las células meristemáticas entre ambos cotiledones. Escalas: 20 μm (H y J), 10 μm (A-G e I).



La etapa de transición (Fig. 13C) presenta divisiones periclinales en los extremos laterales apicales del embrión que eventualmente darán origen a los cotiledones. Las células hijas de la hipófisis se dividen transversalmente, mientras que el resto de las células rodeadas por el protodermis se dividen longitudinal y transversalmente, a excepción de las células precursoras del centro de organización.

En la etapa de corazón (Fig. 13D) se observan las iniciales de los cotiledones, mientras que el desarrollo del córtex continúa por divisiones transversales. Por otra parte, el desarrollo de las células hijas de la hipófisis parece haberse detenido. La etapa de corazón tardía (Fig. 13E) se caracteriza por el alargamiento de los cotiledones mediante divisiones transversales, mientras que su ensanchamiento por divisiones longitudinales ocurre durante la etapa de torpedo (Fig. 13F-H).

En la etapa de torpedo los cotiledones ya se han formado no hay separación evidente entre ellos (Fig. 13F). Inicialmente, las células del embrión tienen un citoplasma denso y núcleos de gran tamaño, así como algunas vacuolas. Posteriormente, en el embrión casi maduro (Fig. 13G) se observa que las células precursoras del centro de organización se encuentran por debajo de un estrato de células entre ambos cotiledones y el citoplasma tiene una menor densidad. En esta etapa, el embrión ocupa todo el espacio disponible en la semilla, sin separación entre ambos cotiledones (Fig. 13H).

Una vez que la semilla ha madurado completamente, se observa que un grupo de células ubicado entre ambos cotiledones muestran un citoplasma más denso y núcleos de mayor tamaño respecto a las células circundantes (Fig. 13I). Adicionalmente, el ensanchamiento del embrión ocasiona la compresión de los estratos de la cubierta seminal, a excepción de la más externa (Fig. 13J).

Desarrollo del suspensor

La compresión del suspensor no ocurre hasta las últimas etapas del desarrollo embrionario y es posible identificar cada una de sus células (h, m y ci) aún después de la

incorporación de la hipófisis y sus descendientes al proembrión (Figs. 12 y 13). La característica más destacable del suspensor es la presencia del haustorio micropilar, el cual se expande lateralmente durante el desarrollo del proembrión (Fig. 12E-I) y permanece con pocos cambios en su tamaño hasta la etapa del embrión globular (Fig. 14A). El crecimiento horizontal del haustorio comienza nuevamente en la etapa de Desarrollo del suspensor

La compresión del suspensor no ocurre hasta las últimas etapas del desarrollo embrionario y es posible identificar cada una de sus células (h, m y ci) aún después de la incorporación de la hipófisis y sus descendientes al proembrión (Figs. 12 y 13). La característica más destacable del suspensor es la presencia del haustorio micropilar, el cual se expande lateralmente durante el desarrollo del proembrión (Fig. 12E-I) y permanece con pocos cambios en su tamaño hasta la etapa del embrión globular (Fig. 14A). El crecimiento horizontal del haustorio comienza nuevamente en la etapa de torpedo (Fig. 14B), lo cual resulta en una expansión considerable hacia los tejidos de la testa y entre ambos tegumentos, además de la formación de plegamientos de la pared. torpedo (Fig. 14B), lo cual resulta en una expansión considerable hacia los tejidos de la testa y entre ambos tegumentos, además de la formación de plegamientos de la pared.

A medida que continúa el desarrollo, no se observa mayor expansión horizontal del haustorio entre ambos tegumentos y el citoplasma es denso (Fig. 14C). En el embrión casi maduro (Fig. 14D), el haustorio se encuentra rodeado de células con escaso citoplasma o completamente ausente, mientras que el citoplasma del haustorio presenta una gran cantidad de vacuolas y es menos denso respecto a las etapas anteriores. En la semilla madura (Fig. 14E), el crecimiento del embrión ocasiona el colapso del suspensor, cuyas paredes se encuentran engrosadas.

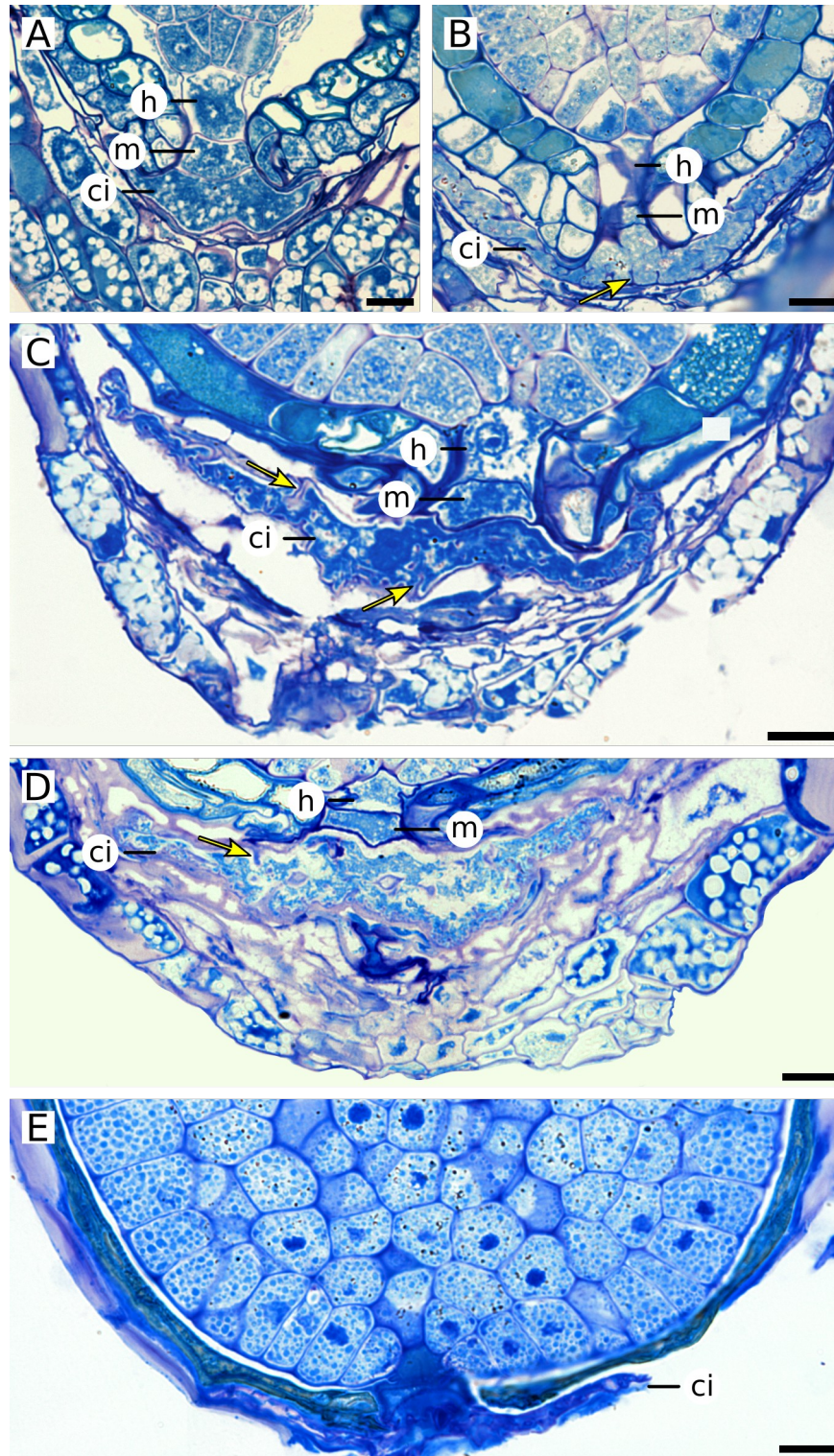


Fig. 14. A-D. Desarrollo del suspensor durante le embriogénesis. **A.** Etapa globular. **B-C** Etapa de torpedo. **D.** Embrión casi maduro **E.** Embrión maduro Las flechas indican plegamientos de la pared celular. Escalas. 10 μ m.

División de la hipófisis

La división de la hipófisis se presentó en dos etapas del desarrollo temprano. En ocasiones, los proembriones de cuatro células presentaron una división longitudinal en la hipófisis (Figs. 15A), mientras que en otras ocasiones esta etapa tenía la hipófisis intacta (Fig. 12F y 15A). En los proembriones de 16 células, la hipófisis podía (Fig. 12H y 15C) o no presentar divisiones (Fig. 15D).

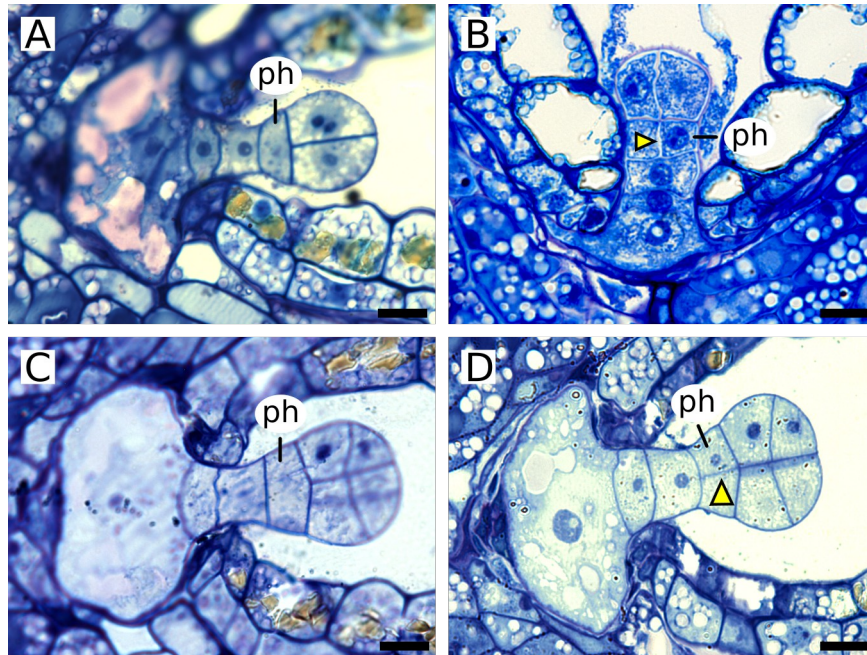


Fig. 15. A-D. División de la hipófisis. **A-B.** Proembrión de cuatro células. **C-D.** Proembrión de 16 células. En ambas etapas se muestra la hipófisis intacta (**A** y **C**) y dividida (**B** y **D**). ph: hipófisis. Las cabezas de flecha señalan la división vertical. Escalas: 10 μ m

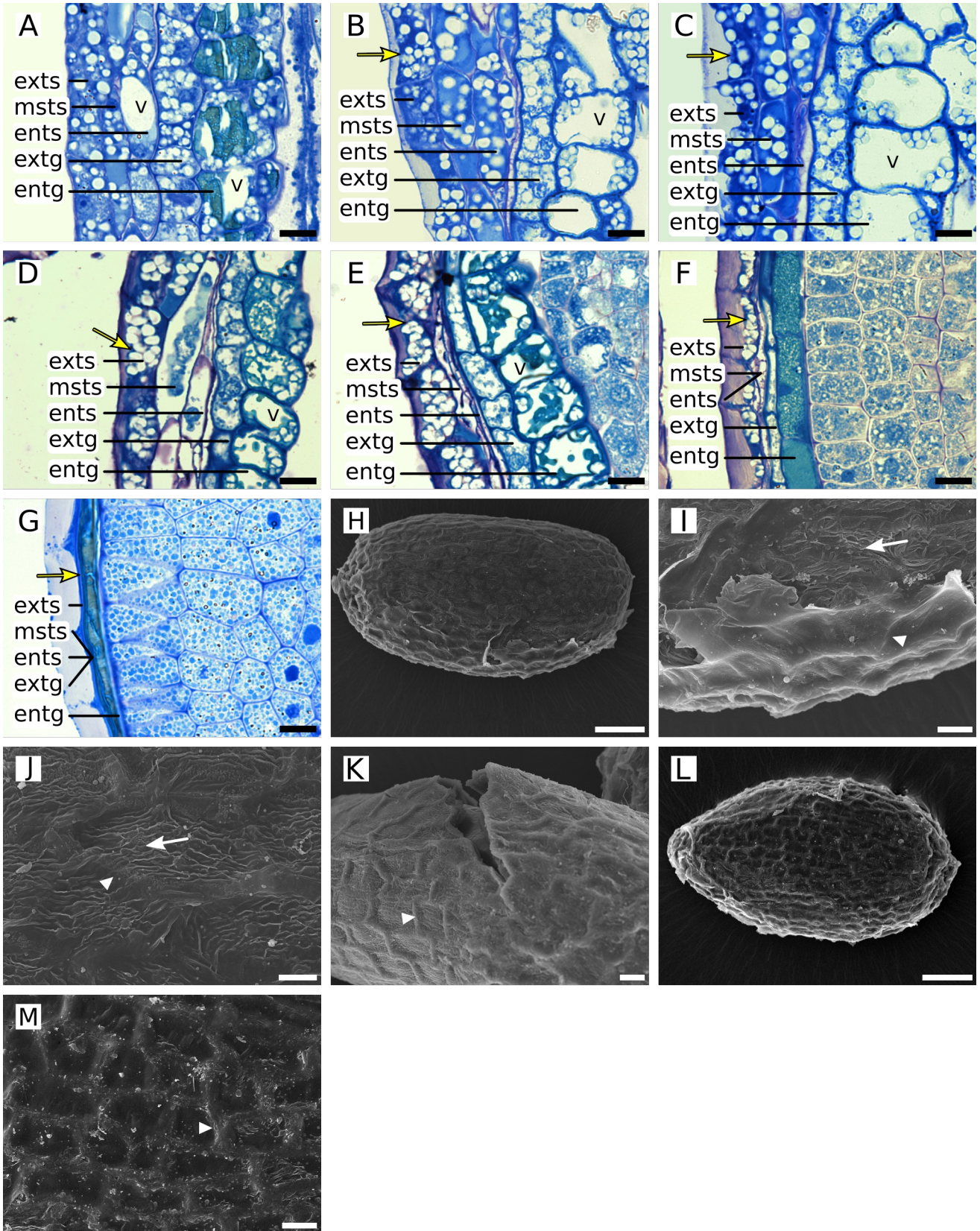
Desarrollo de la cubierta seminal

En la etapa del proembrión de una célula (Fig. 16A), la testa está conformada por tres estratos que son la exotesta, mesotesta y endotesta, mientras que el tegmen es biestratificado conformado por el exotegmen y endotegmen. Todos los estratos de la cubierta seminal almacenan gran cantidad de granos de almidón y se observa la presencia de algunas vacuolas. Las células del endotegmen son de mayor tamaño respecto a los otros estratos y almacenan compuestos fenólicos. Durante el proembrión

de cuatro células (Fig. 16B) no se aprecian cambios en la concentración de almidón en la mesotesta y endotesta, pero sí es visible una disminución en las reservas del tegmen. Las células del endotegmen cuentan con una vacuola que cubre la mayor parte de la célula, por lo que los granos de almidón se encuentran restringidos a las paredes y los compuestos fenólicos han desaparecido. En la exotesta, el citoplasma comienza a restringirse hacia la pared periclinal interna, dejando un espacio en la pared externa.

Durante la etapa del proembrión de 16 células (Fig. 16C) continúa la restricción del citoplasma hacia la pared interna en la exotesta, mientras que las células de la endotesta comienzan a colapsar. En la etapa del embrión globular (Fig. 16D), las células de la mesotesta y la endotesta presentan citoplasma escaso, y no se observa la presencia de granos de almidón, a diferencia de la exotesta en donde aún se observan abundantes reservas a pesar de la restricción del citoplasma. Por otra parte, en el endotegmen comienzan a presentarse nuevamente compuestos fenólicos en el interior de la vacuola. En la etapa de torpedo (Fig. 16E) las células de la mesotesta y endotesta han colapsado y las células del exotegmen presentan una reducción en la cantidad de granos de almidón. En las células de la exotesta es visible la acumulación de mucílago en el espacio comprendido entre el citoplasma y la pared periclinal externa.

▼ **Fig. 16. A-G.** Desarrollo de la cubierta seminal. **A.** Proembrión de una célula con suspensor de cuatro células. **B.** Proembrión de cuatro células, la flecha negra señalan el borde del citoplasma de la exotesta. **C.** Proembrión de 16 células. **D.** Etapa globular tardía. **E.** Etapa de torpedo. **F.** Embrión casi maduro. **G.** Semilla madura. **H-K.** Micrografías electrónicas de semillas maduras intactas. **H.** Semilla completa. **I.** Acercamiento de la semilla en **H**, se muestran los plegamientos visibles en la pared interna de la exotesta (flecha blanca) y los engrosamientos de las paredes anticlinales (cabeza de flecha blanca). **J.** Pared interna de la exotesta. **K.** Pared externa de la exotesta. **L-M.** Semillas maduras después de la imbibición y remoción del mucílago. **L.** Semilla completa sin pared externa de la exotesta. **M.** Pared interna sin plegamientos. V: vacuola. Escalas: 10 μm (A-G, I, K y M), 50 μm (H y L), 5 μm (J).



En el embrión casi maduro (Fig. 16F), el citoplasma de la exotesta se limita a una franja en la pared periclinal interna y a una pequeña porción de las paredes anticlinales en donde todavía se observa la presencia de granos de almidón, el resto de las células están ocupadas por mucílago. En esta etapa, el exotegmen colapsa completamente, mientras que las células del endotegmen se encuentran llenas de compuestos fenólicos. Una vez que la semilla ha madurado (Fig. 16G), el crecimiento del embrión ocasiona el colapso del endotegmen, en donde son aún visibles los compuestos fenólicos. La exotesta ya no cuenta con citoplasma, únicamente se observa el engrosamiento de la pared periclinal interna y de las paredes anticlinales.

En la superficie de la semilla madura (Fig. 16H) es posible observar los engrosamientos laterales (Fig. 16I), así como plegamientos en la pared interna (Fig. 16J). A lo largo de la superficie de la semilla no se observa la presencia de una columnela en el centro de la célula (Fig. 16K). Aquellas semillas que fueron tratadas con agua y cuyo mucílago fue removido presentaron una mayor área carente de la pared externa de la exotesta (Fig. 16L). En la pared interna de estas semillas aún son apreciables los engrosamientos de las paredes laterales, pero no se encuentran los plegamientos de la pared (Fig. 16M).

Reservas de nutrientes en el embrión

Las pruebas de lugol confirmaron la presencia de granos de almidón en cada uno de los estratos de la cubierta seminal al inicio del desarrollo (Fig. 17A). Durante la etapa de corazón tardía (Fig. 17B) se observó la presencia de granos de almidón en el haustorio del suspensor, así como pequeños granos en el embrión. El avance del desarrollo resulta en la presencia de escasos granos de almidón únicamente en la exotesta y la endotesta. Para la etapa de torpedo, el haustorio del suspensor ya no presenta almidón, mientras que algunos granos pequeños se encuentran en el embrión (Fig. 17C). Una vez que la semilla ha madurado ya no hay reservas en la cubierta seminal y el embrión tiene escasos granos de almidón muy pequeños (Fig. 17D).

La prueba de azul-negro de naftol indica que las células de la cubierta seminal, a excepción del endotegmen, presentan altas concentraciones de proteínas en su citoplasma, desde etapas iniciales del desarrollo, las cuales se encuentran en menor concentración en el embrión y en el suspensor (Figs. 17E y F).

En la etapa de torpedo temprana (Fig. 17G) aumenta la concentración de proteínas en el embrión, así como en el suspensor. En la semilla madura (Fig. 17H) se observa una gran cantidad de cuerpos proteicos en las células del embrión.

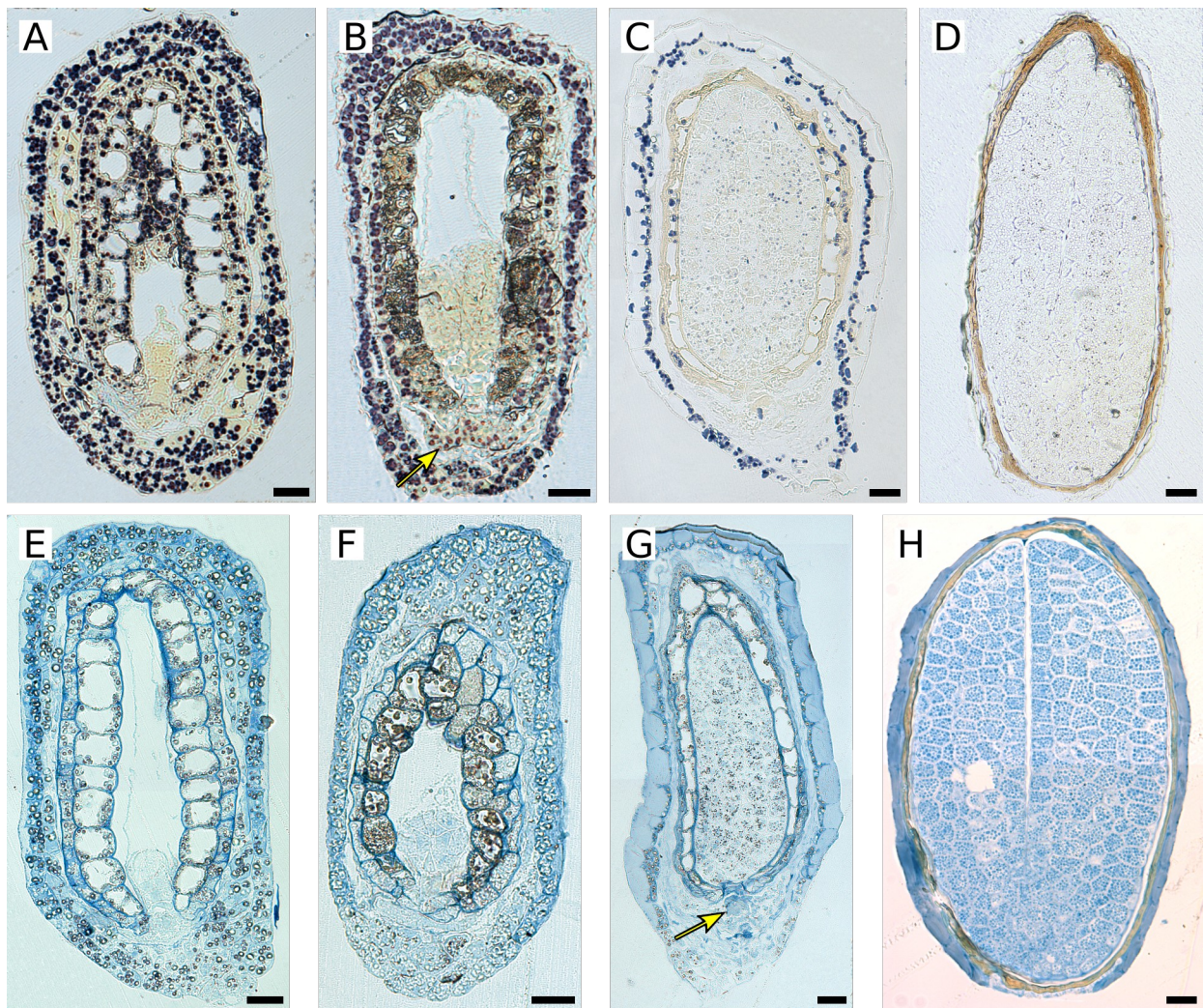


Fig. 17. A-D. Prueba de Lugol. A. Proembrión de dos células. B. Etapa de corazón tardía. C. Etapa de torpedo. D. Semilla madura. E-F. Detección de proteínas con azul negro de naftol. E. Proembrión de dos células. F. Embrión globular. G. Etapa de torpedo temprana. H. Semilla madura. Las flechas indican la presencia de almidón y proteínas en el suspensor. Escala: 20 μm .

Discusión

El meristemo apical es reducido sin estratos de la túnica

El desarrollo de *M. foeniculaceum* es comparable al de otros miembros de Podostemoideae, particularmente tiene mayor similitud con el de *Z. lichenoides*. A partir de la formación de la protodermis fue posible distinguir un par de células internas ubicadas por debajo de la epidermis embrionaria, las cuales fueron identificadas por Katayama *et al.* (2011) en *Z. lichenoides* como las precursoras del centro de organización. De manera similar a sus observaciones, los cotiledones del embrión maduro de *M. foeniculaceum* (Fig. 14G-J) no presentan ningún espacio visible entre ellos (Fig. 14G e I), lo cual indica que no ocurrió la diferenciación de las células precursoras del estrato L1. Esta organización sugiere que *M. foeniculaceum* cuenta con un meristemo apical reducido similar al de *Z. lichenoides* (Katayama *et al.*, 2011).

La presencia de un meristemo apical reducido es consistente con la formación de una plúmula en *M. foeniculaceum* después de la germinación, la cual degenera antes de que se forme el cuerpo vegetativo adventicio que surge del hipocótilo (Rutishauser *et al.*, 1999), indicando que el meristemo apical resultante de la embriogénesis no contribuye en la formación de los órganos que guían el crecimiento de la planta adulta.

La condición transitoria del meristemo apical de *Z. lichenoides* ha sido relacionada con la división de las células precursoras del centro de organización durante la embriogénesis (Katayama *et al.*, 2011). El patrón de expresión *ZISTM* al inicio de la germinación también sugiere que el centro de organización de *Z. lichenoides* es transitorio, ya que su expresión se restringe a las células precursoras del centro de organización en la etapa de torpedo, pero durante el desarrollo de la plántula, la zona de expresión de *ZISTM* cambia del centro de organización a las células epidérmicas de la cara adaxial de los cotiledones, en donde se forman las hojas de la plúmula (Katayama *et al.*, 2013).

Si bien el meristemo apical reducido que resulta de la embriogénesis no contribuye al cuerpo de la planta adulta, la misma organización ocurre en los tallos adventicios de *H. japonicum* y *Cladopus doianus* (Podostemoideae). Estos meristemas anatómicamente indistinguibles expresan homólogos de *STM* en la cara adaxial de la hoja en formación, por lo cual han sido llamados meristemas apicales simpodiales, cuyo crecimiento es determinado. De este modo las nuevas hojas se forman a partir de la cara adaxial de la hoja previamente formada (Katayama *et al.*, 2010), de manera similar al desarrollo del meristemo apical del tallo (resultado de la embriogénesis) de *Z. lichenoides*, en donde la expresión de *STM* se traslada del centro de organización a la cara adaxial de los cotiledones en donde se forman las hojas de la plúmula de manera similar a un meristemo apical simpodial (Katayama *et al.*, 2013).

Este crecimiento determinado podría ser otra explicación de las elevadas tasas de mutación que se han presentado en la familia. En ausencia de un centro de organización, las células del meristemo apical reducido podrían dividirse con mayor frecuencia, incrementando el número de mutaciones (Katayama *et al.*, 2022).

En el caso de *M. foeniculaceum* es posible que las células precursoras del centro de organización también se dividan antes de la completa maduración del embrión debido a la presencia de células con citoplasma más denso en el embrión maduro (Fig. 14H). Este conjunto se extiende hacia los lados y por debajo de la región comprendida entre ambos cotiledones, en un patrón similar al de expresión de *ZISTIM* en *Z. lichenoides*, lo cual podría indicar su identidad como células meristemáticas y debido a la presencia de la plúmula en *M. foeniculaceum*, es posible que el centro de organización sea igualmente transitorio.

La similitud en tamaño y forma de las células del meristemo apical respecto a las adyacentes también ha sido reportada en *Indotristicha ramossisima*, cuyas regiones del meristemo apical y de la hipófisis han sido descritas como anatómicamente

indiferenciadas y únicamente identificables por su posición en el embrión (Nagendran *et al.*, 1981).

Las hipófisis y sus descendientes pierden la organización que da origen al meristemo radicular

La primera división de la hipófisis en *A. thaliana* suele ocurrir en la etapa globular y parte importante de su especificación involucra que esta división inicial debe ocurrir transversalmente. En el caso de *M. foeniculaceum*, la división ocurre de manera prematura y de manera vertical como en *Z. lichenoides* e *H. japonicum* (Katayama *et al.*, 2011). Sin embargo, en *M. foeniculaceum* se observó que esta división puede ocurrir desde el proembrión de cuatro células (Fig 15B) y también en el proembrión de 16 células (Fig. 15D), mientras que en *Z. lichenoides* e *H. japonicum* ocurre en el dermatógeno.

El momento en el que ocurren divisiones durante la embriogénesis está relacionado con un patrón regular de divisiones celulares poco variable en las angiospermas, el cual es determinado por diferentes mecanismos de control. Uno de ellos es el transporte y acumulación de auxinas en diferentes regiones del embrión a lo largo del desarrollo. En *A. thaliana*, la presencia de auxinas está restringida a la célula apical después de la división inicial del cigoto y permanece restringida a las células del proembrión hasta la etapa de ocho células. Durante la etapa globular, las auxinas se acumulan en la hipófisis debido a la actividad de los transportadores PIN1 ubicados en las paredes basales de las células del proembrión.

Esta acumulación en la hipófisis está relacionada con su adecuada división, ya que embriones mutantes carentes de genes responsables de biosíntesis, transporte, recepción y/o respuesta a auxinas presentan una hipófisis cuya primera división ocurre verticalmente, lo cual lleva a que no se forme la radícula. Otras modificaciones en el desarrollo relacionadas con alteraciones en la actividad de auxinas son la división

transversal en lugar de longitudinal en la célula apical y la fusión o ausencia de los cotiledones en la etapa de corazón (Moller y Weijers, 2009).

En *M. foeniculaceum*, la división vertical de la hipófisis podría deberse a modificaciones en los mecanismos de biosíntesis y transporte que ocasionan la acumulación de auxinas durante la etapa globular. Sin embargo, en *T. brevis* (Fig. 10B) la hipófisis también se divide verticalmente, aunque ello ocurre en una etapa comparable a la de *A. thaliana* (Fig. 10A) y sí se forma el par de células precursoras del centro quiescente. Esto podría indicar que el cambio que ocasiona la ausencia de la radícula no es la dirección de la división inicial, sino el momento en el cual ocurre.

En *Z. lichenoides* e *H. japonicum* la primera división de la hipófisis ocurre en la etapa del dermatógeno, posterior a lo observado en *M. foeniculaceum* pero aún prematuro comparado con *T. brevis*. La ausencia de especificación en esta región podría también ser la razón por la cual la división de *M. foeniculaceum* puede ocurrir en dos etapas del desarrollo. De acuerdo con esto, la división inicial de la hipófisis en *M. foeniculaceum* podría no requerir la acumulación de auxinas y de esta manera iniciar la trayectoria que concluye en la ausencia del centro quiescente.

Modificación en el desarrollo radial

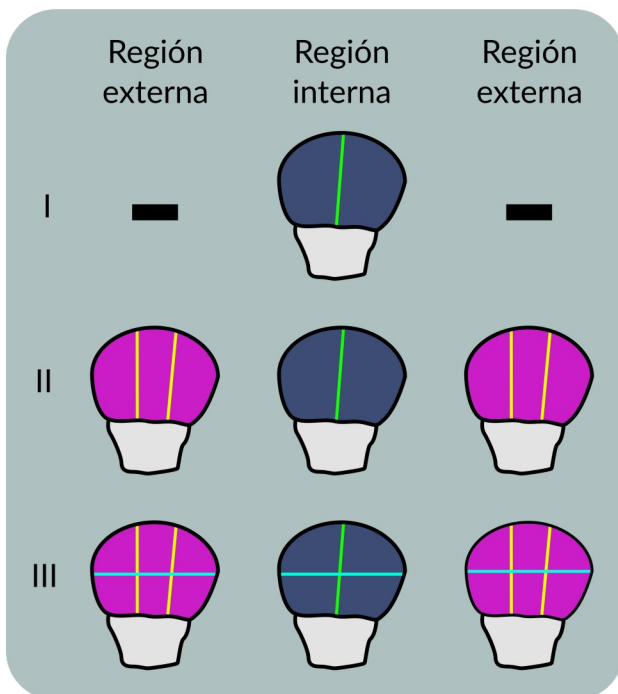
Después del proembrión de cuatro células (Fig. 12F y Fig. 18AI) se observó que el desarrollo de *M. foeniculaceum* continúa con la formación de dos regiones externas y una interna (Fig. 12G-J). Cada una de las regiones externas cuenta inicialmente con tres células (Fig. 12J), y en este momento la región interna cuenta con un plano de división vertical previamente establecido en el proembrión de cuatro células (Fig. 12F), por lo cual el proembrión cuenta con ocho células (Fig. 18AII). Posteriormente ocurre una división transversal que da origen al proembrión de 16 células (Fig. 18AII).

Este patrón de desarrollo difiere al reportado en *A. thaliana*, donde se establece una simetría radial como resultado de dos divisiones longitudinales perpendiculares que

originan al proembrión de cuatro células (Batygina, 2006). A partir de esta organización se forma la epidermis y ocurre el desarrollo radial mediante divisiones periclinales que originan nuevos estratos concéntricos (Figs. 4 y 18B).

La formación de las regiones externas en *M. foeniculaceum* indican a que no hay una organización transversal con simetría radial en el proembrión de ocho y 16 células, lo cual podría implicar una modificación en la especificación de los tejidos vasculares que dependen de esta organización radial (Fig. 18BII). Sin embargo, sí ocurrió la formación del protodermis (Fig. 12J), lo cual podría implicar un patrón diferente en *M. foeniculaceum* que se ajuste a su simetría bilateral para la formación de este tejido.

A. Desarrollo longitudinal



B. Desarrollo trasversal

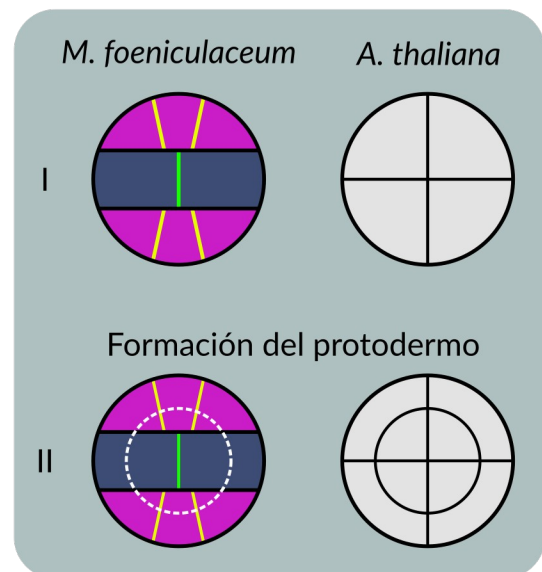


Fig. 18. Desarrollo del proembrión de 16 células de *M. foeniculaceum*. **A.** Vista longitudinal de las regiones externas e interna de los proembriones. **I.** 4 células. **II.** 8 células. **III.** 16 células. La región interna está indicada con azul y la región externa con rosa. Las líneas verdes indican divisiones verticales en la región central, las líneas amarillas indican divisiones verticales de las regiones externas. Las líneas azules representan la división transversal. **B.** Vista transversal del proembrión de *M. foeniculaceum* y *A. thaliana*. **I.** Antes de la formación del protodermo. **II.** Después de la formación del protodermo. La línea punteada blanca muestra una posible división concéntrica en *M. foeniculaceum*.

Tomando en cuenta esta modificación transversal, el desarrollo embrionario de *M. foeniculaceum* forma el proembrión de ocho células al establecer dos regiones externas (Fig. 19D), seguida de la formación del proembrión de 16 células (Fig. 19E). A partir de esta configuración se forma el protodermis (Fig. 19F), se establecen las células precursoras del centro de organización y la hipófisis se divide verticalmente (Fig. 19F). Para la etapa de torpedo las células hijas de la hipófisis se han dividido en múltiples direcciones sin formar una estructura distinguible (Fig. 19I), mientras que las células precursoras del centro de organización se dividen antes de la maduración del embrión (Fig. 19J).

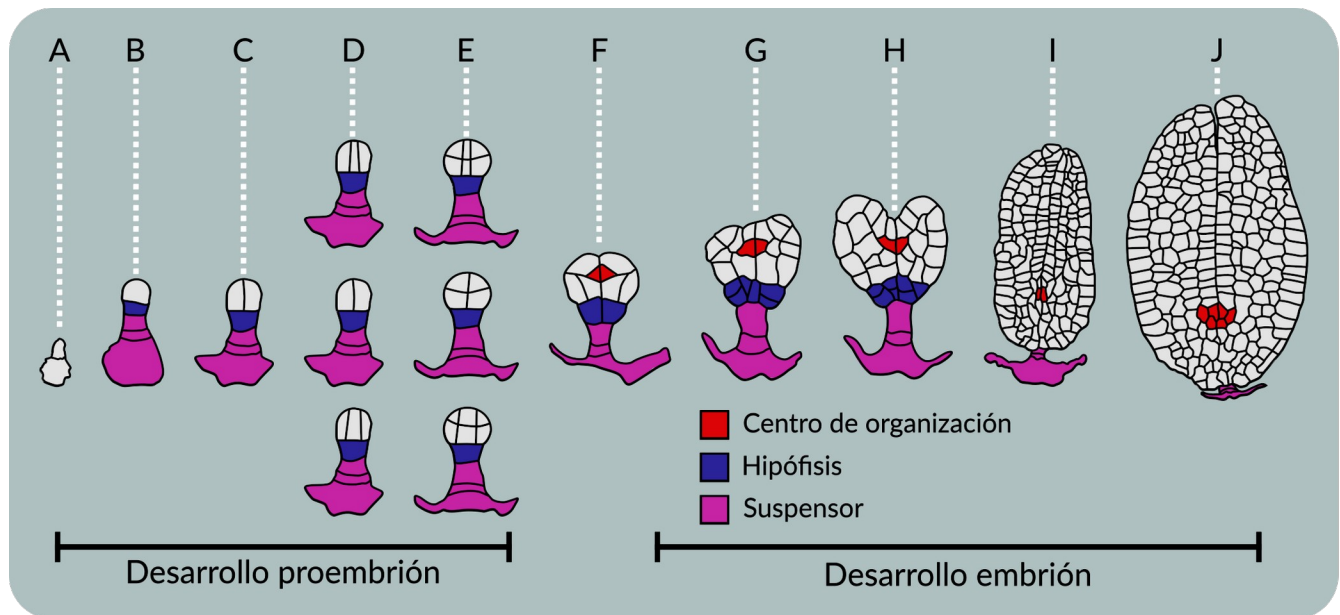


Fig. 19. Desarrollo embrionario de *M. foeniculaceum*. En D y en E se muestran las regiones externas del proembrión. A. Proembrión de una célula. B. Proembrión de una célula con suspensor de cuatro células. C. Proembrión de cuatro células. D. Proembrión de 8 células, E. Proembrión de 16 células. F. Dermatógeno. G. Embrión globular. H. Etapa de corazón. I. Etapa de torpedo. J. Embrión maduro. Los esquemas no están a escala.

La presencia del suspensor en etapas avanzadas del desarrollo sugiere su participación en la nutrición del embrión

La presencia del suspensor cuando el embrión se encuentra casi maduro, (Figs. 13 y 14), así como el hecho de que la expansión lateral del haustorio comienza en la etapa de torpedo (Fig. 14B) sugieren que el suspensor se encuentra activo al menos hasta esta etapa. Su participación en la embriogénesis probablemente está relacionada con el transporte de nutrientes hacia el embrión debido a la presencia de almidón (Fig. 17B) y de proteínas (Fig. 17F) en sus células durante las etapas de corazón y torpedo, respectivamente. En *Brassica napus* se han identificado granos de almidón en el suspensor durante las primeras etapas del desarrollo, antes de la etapa globular (Tykarska, 1982), mientras que en *Trifolium repens* (Fabaceae) el suspensor se ha identificado como una vía para el transporte de metabolitos hacia el embrión (Jakobsen, 1994).

En Podostemaceae, la presencia de un haustorio micropilar también ha sido reportada en *Indotristicha ramossisima* (Mukkada y Chopra, 1973) y *Terniola zeylanica* (Mukkada, 1969). En ambos casos se trata de un haustorio no ramificado comparable al de *M. foeniculaceum*, con la diferencia que se tratan de estructuras multinucleadas. En ambos casos, se ha sugerido que el suspensor podría contribuir a la nutrición del embrión, particularmente en ausencia de endospermo y/o perispermo.

El suspensor ha sido reconocido como una estructura relevante en el desarrollo embrionario de algunas angiospermas. En el caso de *A. thaliana*, plasmodesmos presentes en el suspensor permiten el transporte de azúcares hacia el embrión en desarrollo, conexión que termina en la etapa globular, antes de la muerte del suspensor. Las conexiones mediante plasmodesmos también existen en los tegumentos interno y externo, cada uno de los cuales forma un dominio simplástico entre sus propios estratos pero que cuenta con una barrera apoplástica que separa ambos tegumentos. El dominio formado por el tegumento externo actúa como una continuación del tejido

vascular que termina en el funículo. Esta configuración, permite que el transporte mediante plasmodesmos ocurra de manera centrípeta, más no hacia el interior de los tejidos de tal modo que el suspensor es la única vía de comunicación con el embrión (Stadler *et al.*, 2005).

Conexiones simplásticas que conectan el embrión y el endospermo con el suspensor también han sido observadas en *Sedum* (Crassulaceae). Además, la célula basal del suspensor forma un haustorio que penetra los tejidos maternos y contribuye con la absorción y translocación de nutrientes durante etapas tempranas del desarrollo embrionario a través de conexiones apoplásticas (Kozieradzka-Kiszkurno *et al.*, 2020). Esta conexión entre el suspensor y los tejidos maternos involucra la especialización del haustorio formado por la célula basal del suspensor, la cual actúa como una célula de transferencia, cuya pared celular secundaria forma proyecciones que facilitan el flujo de solutos entre ambas células (Talbot *et al.*, 2002)

El transporte apoplástico a través del suspensor también ha sido sugerido en *Cymbidium sinense* (Orchidaceae), una orquídea cuyas células del suspensor se elongan antes de que el desarrollo del proembrión avance de la etapa de cuatro células. Como resultado, las células del suspensor forman estructuras filamentosas que están en contacto con la cubierta seminal. Estas células carecen de cutícula y cuentan únicamente con pared celular primaria (Yeung, 1996).

Otro ejemplo de participación activa del suspensor en el desarrollo embrionario ocurre en *Phaseolus coccineus*, en donde se producen auxinas (Lorenzi *et al.*, 1978) y giberelinas (Cionini *et al.*, 1976) antes de que el embrión adquiera la capacidad de sintetizarlas. Los diferentes tipos de transporte existentes entre el suspensor y el embrión podrían presentarse en *M. foeniculaceum*, en donde el suspensor podría participar en el transporte de nutrientes desde los tejidos maternos hacia el embrión mediante conexiones simplásticas, lo cual resulta de particular importancia considerando la gran cantidad de almidón almacenado en los estratos de la cubierta

seminal. Si es que los estratos de la testa y el tegmen de *M. foeniculaceum* forman dominios simplásticos similares a los de *A. thaliana*, el crecimiento del suspensor entre ambos tejidos podría indicar el transporte apoplástico, de manera similar a los haustorios de *Sedum* y *Cymbidium sinense*.

La semilla de *M. foeniculaceum* es mixospérmica

El desarrollo de la cubierta de *M. foeniculaceum* involucra la producción de mucílago en la exotesta, cuya tinción morada con azul de toluidina sugiere que está conformado por pectinas (Western *et al.*, 2000). En *A. thaliana*, la aparición de granos de almidón ocurre antes de que comience la producción de mucílago en la etapa de corazón o de torpedo (Beeckman *et al.*, 2000). En cambio, la cubierta seminal de *M. foeniculaceum* cuenta con granos de almidón desde las primeras etapas del desarrollo (Fig. 12A y 17A) y la producción del mucílago es apreciable desde que el proembrión cuenta con cuatro células (Fig. 16B).

La presencia de mucílago en el estrato más externo de la semilla ha sido reportada para otros miembros de Podostemaceae, lo cual podría estar relacionado con la zoocoria al adherirse al cuerpo de aves (Mukkada, 1969; Mukkada y Chopra, 1973). De igual manera la liberación del mucílago en contacto con el permite que las semillas se adhieran al sustrato rocoso de los ríos y una vez que el mucílago se seca, las semillas permanecen firmemente adheridas (Philbrick y Novelo, 2004).

La producción de mucílago es una característica común dentro de las angiospermas, a la cual se le han atribuido funciones ecológicas relacionadas con la dispersión de la semilla y protección durante la germinación debido a su consistencia pegajosa y a sus propiedades higroscópicas. Es una propiedad con amplia variación en diversos atributos, como puede ser la composición de los polisacáridos, el sitio de producción, la organización de las células secretoras de mucílago, la forma de extrusión,

etc. Como resultado, las funciones ecológicas relacionadas con el mucílago cambian de una especie a otra (Viudes *et al.*, 2020).

En el caso de *Lepidium perfoliatum* (Brassicaceae), la presencia de mucílago tiene un efecto positivo en la tasa de germinación bajo condiciones de abundancia y exceso de agua, pero bajo condiciones de estrés hídrico ocurre una reducción en la tasa de germinación. La ausencia de un efecto protector por parte de mucílago frente a condiciones de escasa humedad se debe a que *L. perfoliatum* es una planta que habita en regiones áridas y semi áridas. Sin embargo su ciclo de vida es efímero y depende de la acumulación de nieve al inicio de la primavera que al derretirse provee un ambiente con abundante agua por un corto periodo de tiempo (Huang *et al.*, 2015).

La especificidad del efecto del mucílago también ha sido observada en especies del desierto de Arabia. Si bien su presencia favorece la retención de agua, el efecto que tiene en la tasa de germinación es diferente para cada especie y depende del termoperiodo y del fotoperiodo (Gairola *et al.*, 2022), lo cual sugiere que el mucílago forma parte de una serie de factores que intervienen en la respuesta frente a una presión ecológica (Bhatt *et al.*, 2016).

Se ha sugerido que el mucílago de *M. foeniculaceum* podría favorecer la germinación mediante la difusión de agua del sustrato a la semilla. Debido a que la germinación no ocurre únicamente en presencia de humedad atmosférica, el incremento en el nivel del agua es necesario para que la semilla obtenga agua. Bajo estas circunstancias, el mucílago podría permitir el aprovechamiento de agua que salpica en las rocas. De este modo, el mucílago de *M. foeniculaceum* podría contribuir no solo con la adhesión al sustrato, sino también al transporte de agua, lo cual afecta la tasa de germinación junto con la temperatura y calidad de la luz (Reyes-Ortega *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos podrían proteger a la semilla

Las semillas de *M. foeniculaceum* presentan compuestos fenólicos en el endotegmen, el cual corresponde al endotelio de *A. thaliana* ya que ambas son los estratos más internos de la cubierta seminal. La presencia de compuestos fenólicos en Podostemaceae en *Indotristicha ramossisima* (Mukkada y Chopra, 1973) y en *Terniola zeylanica* (Mukkada, 1969), ha sido reportada en la exotesta antes de que comience la síntesis de mucílago.

La presencia de compuestos fenólicos en las semillas cumple con funciones de protección contra factores bióticos y abióticos. En *A. thaliana* contribuyen a la coloración de las semillas junto con el resto de los estratos colapsados y protegen al embrión de radiación ultravioleta durante su desarrollo temprano (Western *et al.*, 2000). De igual manera mantienen la latencia de las semillas promoviendo la impermeabilidad de la cubierta seminal y en su ausencia ocurre un menor engrosamiento de las paredes del endotelio (Debeaujon *et al.*, 2000). En leguminosas, la permeabilidad de las semillas carentes de compuestos fenólicos está asociada con mayor daño al tejido de los cotiledones durante la imbibición y mayor susceptibilidad a infección por hongos (Powell, 1989).

En *A. thaliana*, los compuestos fenólicos también se encuentran en células de la cálaza y el micrópilo, de tal manera que tanto el embrión como el suspensor están rodeados por células que contienen compuestos fenólicos. Debido a la impermeabilidad conferida por estos compuestos y a que protegen contra microorganismos, el embrión se encuentra completamente aislado (Debeaujon *et al.*, 2003). Este aislamiento es reforzado por la presencia de una capa lipídica en la pared interna del endotegmen, de tal manera que el transporte de nutrientes es improbable a través de la superficie de este estrato (Beeckman *et al.*, 2000).

En *M. foeniculaceum*, el endotegmen rodea al embrión maduro en la porción calazal así como en los laterales (Fig. 13H), por lo cual el micrópilo está desprotegido

pero la presencia del suspensor colapsado en la semilla madura podría actuar como una barrera protectora adicional en la región micropilar de la semilla (Fig. 13 E) debido a que tiene sus paredes engrosadas. Adicionalmente, las semillas de *M. foeniculaceum* carecen de latencia (Reyes-Ortega *et al.*, 2009), por lo que la función de los compuestos fenólicos podría ser principalmente de protección sin prevenir la germinación de la semilla.

Conclusiones

El desarrollo embrionario de *M. foeniculaceum* es similar al de *Z. lichenoides* debido a que cuenta con un meristemo apical reducido, en el cual las células precursoras del centro de organización se dividen antes de que el embrión madure por completo. Además, no se observó la formación de la radícula debido la división prematura de la hipófisis, la cual ocurrió en etapas más tempranas comparado con otros miembros de Podostemoideae. Esto sugiere que el momento de esta primera división es más importante que la dirección en la que ocurre para explicar la desaparición del centro quiescente.

El uso de marcadores moleculares podría reforzar la noción de que las células observadas con núcleos grandes y citoplasma denso entre ambos cotiledones tienen identidad meristemática, además de que se podría evaluar su expresión durante la germinación para obtener información adicional acerca de la pérdida del plan corporal vertical. Por otra parte, la división temprana de la hipófisis podría ser explicada en parte por cambios en la actividad de auxinas durante etapas tempranas del desarrollo, lo cual podría ser estudiado a través del transporte y acumulación de esta hormona durante la embriogénesis

El desarrollo embrionario también involucra un cambio en el desarrollo transversal debido a que no se establece una simetría radial en etapas tempranas, lo

cual podría impedir la formación de tejidos vasculares o requerir un patrón diferente para su establecimiento.

Se observó formación del haustorio micropilar, al igual que en otros miembros de Tristichoideae y Podostemoideae. En el caso de *M. foeniculaceum*, parece estar involucrado en el transporte de nutrientes desde los estratos de la cubierta seminal hacia el embrión. Como resultado de este transporte, el almidón y proteínas presentes en la cubierta seminal podrían ser usadas por el embrión, el cual acumula principalmente proteínas una vez que ha madurado. Las conexiones existentes entre el embrión, el suspensor y la cubierta seminal podrían depender de conexiones simplásticas y apoplásticas. La existencia de estas vías de comunicación es de vital importancia debido a la ausencia de endospermo y perispermo en los miembros de la familia, por lo cual deberían ser estudiadas en esta y otras especies.

La semilla de *M. foeniculaceum* es mixospérmica, una característica que ha sido asociada con efectos positivos en la dispersión y germinación. Para determinar el papel ecológico del mucílago con mayor precisión es necesario evaluar su composición, así como la tasa de germinación bajo diferentes condiciones que reflejen los ambientes en los que se distribuye esta especie. La comparación de estos resultados con los de otros miembros de la familia podría indicar si el mucílago tiene efectos diferentes para cada especie y cuál es su función frente a las mismas presiones ambientales en cada una.

Referencias

- Barton, M. K., y Poethig, R. S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: An analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, 119(3), 823–831. <https://doi.org/10.1242/dev.119.3.823>
- Batygina, T. (Ed.). (2006). *Embryology of Flowering Plants. Terminology and Concepts*. (Vol. 2). Science Publishers.

- Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R., y Inzé, D. (2000). Histological Study of Seed Coat Development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 113(2), 139–148. <https://doi.org/10.1007/PL00013924>
- Bhatt, A., Santo, A., y Gallacher, D. (2016). Seed mucilage effect on water uptake and germination in five species from the hyper-arid Arabian desert. *Journal of Arid Environments*, 128, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2016.01.008>
- Bhojwani, S. S., y Bhatnagar, S. P. (2000). *The embryology of angiosperms*. Vikas Pub. House ; Distributed by Advent Books.
- Cionini, P. G., Bennici, A., Alpi, A., y D'Amato, F. (1976). Suspensor, gibberellin and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta*, 131(2), 115–117. <https://doi.org/10.1007/BF00389979>
- Cook, C. D. K., y Rutihauser, R. (2007a). Podostemaceae. In K. Kubitzki, C. Bayer, y P. F. Stevens (Eds.), *Flowering plants: Eudicots ; Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae* (pp. 304–344). Springer.
- Cook, C. D. K., y Rutihauser, R. (2007b). Podostemaceae. In K. Kubitzki, C. Bayer, y P. F. Stevens (Eds.), *Flowering plants: Eudicots ; Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae* (pp. 304–344). Springer.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., y Koornneef, M. (2000). Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122(2), 403–413.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., y Lepiniec, L. (2003). Proanthocyanidin-Accumulating Cells in *Arabidopsis* Testa: Regulation of Differentiation and Role in Seed Development. *The Plant Cell*, 15(11), 2514–2531.
- Evert, R. F., Esau, K., y Esau, K. (2006). *Esau's Plant anatomy: Meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development* (3rd ed). Wiley-Interscience.

- Gairola, S., Mahmoud, T., AlKetbi, A., Shabana, H. A., Carón, M. M., y El-Keblawy, A. (2022). Effect of seed coat mucilage, temperature, and photoperiod on germination of four Arabian desert species. *Botany*, 100(9), 707–715. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0137>
- Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., y Laux, T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131(3), 657–668. <https://doi.org/10.1242/dev.00963>
- Haughn, G. W., y Western, T. L. (2012). Arabidopsis seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00064>
- Huang, D., Wang, C., Yuan, J., Cao, J., y Lan, H. (2015). Differentiation of the seed coat and composition of the mucilage of *Lepidium perfoliatum*: A desert annual with typical myxospermy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(10), 775–787. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv078>
- Jäger-Zürn, I. (1997). Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichoideae). *Aquatic Botany*, 57(1), 151–182. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(96\)01126-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(96)01126-6)
- Jakobsen, H. (1994). Accumulation of Metabolites during Seed Development in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany*, 74(4), 409–415. <https://doi.org/10.1006/anbo.1994.1134>
- Jeong, S., Bayer, M., y Lukowitz, W. (2011). Taking the very first steps: From polarity to axial domains in the early *Arabidopsis* embryo. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1687–1697. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq398>
- Jiménez-Durán, K., Pérez-Pacheco, M. K., Wong, R., Collazo-Ortega, M., y Márquez-Guzmán, J. (2021). Programmed cell death is the cause of central cell degeneration and single fertilization in *Marathrum schiedeanum* (Cham.) Tul (Podostemaceae). *Aquatic Botany*, 169, 103345. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2020.103345>
- Katayama, N., Kato, M., Nishiuchi, T., y Yamada, T. (2011). Comparative anatomy of embryogenesis in three species of Podostemaceae and evolution of the loss of embryonic shoot and root meristems: The loss of embryonic shoot and root meristems

- in Podostemaceae. *Evolution y Development*, 13(4), 333–342. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2011.00488.x>
- Katayama, N., Kato, M., y Yamada, T. (2013). Origin and development of the cryptic shoot meristem in *Zeylanidium lichenoides* (Podostemaceae). *American Journal of Botany*, 100(4), 635–646. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200571>
- Katayama, N., Koi, S., y Kato, M. (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. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073189>
- Katayama, N., Koi, S., Sassa, A., Kurata, T., Imaichi, R., Kato, M., y Nishiyama, T. (2022). Elevated mutation rates underlie the evolution of the aquatic plant family Podostemaceae. *Communications Biology*, 5(1), 75. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03003-w>
- Kawashima, T., y Goldberg, R. B. (2010). The suspensor: Not just suspending the embryo. *Trends in Plant Science*, 15(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.002>
- Kita, Y., y Kato, M. (2001). Intrafamilial Phylogeny of the Aquatic Angiosperm Podostemaceae Inferred from the Nucleotide Sequences of the *matK* Gene. *Plant Biology*, 3(2), 156–163. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12895>
- Koi, S., Ikeda, H., Rutishauser, R., y Kato, M. (2015). Historical biogeography of river-weeds (Podostemaceae). *Aquatic Botany*, 127, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2015.08.003>
- Koi, S., y Kato, M. (2010a). Developmental morphology of seedling and shoot and phylogenetic relationship of *Diplobryum koyamae* (Podostemaceae). *American Journal of Botany*, 97(3), 373–387. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900157>
- Koi, S., y Kato, M. (2010b). Developmental anatomy of seedlings of *Indodalzellia gracilis* (Podostemaceae): Seedling development of *Indodalzellia gracilis*. *Plant Biology*, 12(5), 794–799. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00275.x>
- Kozieradzka-Kiszkurno, M., Majcher, D., Brzezicka, E., Rojek, J., Wróbel-Marek, J., y Kurczyńska, E. (2020). Development of Embryo Suspensors for Five Genera of Crassulaceae with Special Emphasis on Plasmodesmata Distribution and Ultrastructure. *Plants*, 9(3), 320. <https://doi.org/10.3390/plants9030320>

- Long, J. A., y Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development*, 125(16), 3027–3035. <https://doi.org/10.1242/dev.125.16.3027>
- Lorenzi, R., Bennici, A., Cionini, P. G., Alpi, A., y D'Amato, F. (1978). Embryo-suspensor relations in *Phaseolus coccineus*: Cytokinins during seed development. *Planta*, 143(1), 59–62. <https://doi.org/10.1007/BF00389052>
- Márquez-Guzmán, J., Wong, R., Pérez, M., López, L., y Murguía, G. (2016). *Técnicas de laboratorio para el estudio del desarrollo en angiospermas*. Biblioteca Nacional de México.
- Mazzoni-Viveiros, C., y Castro, M. (2016). Recipes and protocols for histochemical tests. *IAWA Journal / International Association of Wood Anatomists*, 37, S1–S9.
- Moller, B., y Weijers, D. (2009). Auxin Control of Embryo Patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a001545–a001545. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001545>
- Mukkada, A. J. (1969). Some Aspects of the Morphology, Embryology and Biology of *Terniola zeylanica* (Gardner) Tulasne. *The New Phytologist*, 68(4), 1145–1158.
- Mukkada, A. J., y Chopra, R. N. (1973). Post-fertilization development in *Indotristicha ramosissima* (Wight) Van Royen. *New Phytologist*, 72(3), 639–6465. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1973.tb04413.x>
- Nagendran, C. R., Swamy, B. G. L., y Arekal, G. D. (1981). A Morphogenetic Approach to the Embryogeny of *Indotristicha* (Podostemaceae). *Annals of Botany*, 47(6), 799–804. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086079>
- Nebesářová, J. (2019). Essential Methods of Plant Sample Preparation for High-Resolution Scanning Electron Microscopy at Room Temperature. In F. Cvrčková y V. Žárský (Eds.), *Plant Cell Morphogenesis* (Vol. 1992, pp. 63–76). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9469-4_4
- Novelo, R. A., Philbrick, C. T., y Crow, G. E. (2009). *Podostemaceae*. <http://legacy.tropicos.org/Name/42000187?projectid=3>
- Park, S., y Harada, J. (2008). Arabidopsis embryogenesis. In M. F. Suárez y P. V. Bozhkov (Eds.), *Plant embryogenesis*. Humana ; Springer [distributor].
- Philbrick, C. T., y Novelo, R. A. (2004). Monograph of *Podostemum* (Podostemaceae). *Systematic Botany Monographs*, 70, 1. <https://doi.org/10.2307/25027922>

- Powell, A. A. (1989). The Importance of Genetically Determined Seed Coat Characteristics to Seed Quality in Grain Legumes. *Annals of Botany*, 63(1), 169–175.
- Quiroz, A. F., Novelo, R. A., y Philbrick, C. T. (1997). Water chemistry and the distribution of Mexican Podostemaceae: A preliminary evaluation. *Aquatic Botany*, 57(1), 201–212. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(96\)01118-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(96)01118-7)
- Radoeva, T., Vaddepalli, P., Zhang, Z., y Weijers, D. (2019). Evolution, Initiation, and Diversity in Early Plant Embryogenesis. *Developmental Cell*, 50(5), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.011>
- Raven, P. H., Evert, R. F., y Eichhorn, S. E. (2013). *Biology of plants* (Eighth edition). W.H. Freeman and Company Publishers.
- Razi, B. A. (1949). Embryological Studies of Two Members of the Podostemaceae. *Botanical Gazette*, 111(2), 211–218. <https://doi.org/10.1086/335588>
- Reyes-Ortega, I., Sánchez-Coronado, M. E., y Orozco-Segovia, A. (2009). Seed germination in *Marathrum schiedeanum* and *M. rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany*, 90(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.04.011>
- Rutishauser, R., Novelo R., A., y Philbrick, C. T. (1999). Developmental Morphology of New World Podostemaceae: *Marathrum* and *Vanroyenella*. *International Journal of Plant Sciences*, 160(1), 29–45. <https://doi.org/10.1086/314097>
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jürgens, G., y Laux, T. (2000). The Stem Cell Population of Arabidopsis Shoot Meristems Is Maintained by a Regulatory Loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* Genes. *Cell*, 100(6), 635–644. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80700-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80700-X)
- Song, S.-K., Hofhuis, H., Lee, M. M., y Clark, S. E. (2008). Key Divisions in the Early Arabidopsis Embryo Require POL and PLL1 Phosphatases to Establish the Root Stem Cell Organizer and Vascular Axis. *Developmental Cell*, 15(1), 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.008>
- Stadler, R., Lauterbach, C., y Sauer, N. (2005). Cell-to-Cell Movement of Green Fluorescent Protein Reveals Post-Phloem Transport in the Outer Integument and Identifies Symplastic Domains in Arabidopsis Seeds and Embryos. *Plant Physiology*, 139(2), 701–712. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065607>

- Stevens, P. F. (2007). Hypericaceae. In K. Kubitzki, C. Bayer, y P. F. Stevens (Eds.), *Flowering plants: Eudicots ; Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae* (pp. 194–201). Springer.
- Talbot, M. J., Offler, C. E., y McCurdy, D. W. (2002). Transfer cell wall architecture: A contribution towards understanding localized wall deposition. *Protoplasma*, 219(3–4), 197–209. <https://doi.org/10.1007/s007090200021>
- Philbrick, C., y Novelo, R. A. (1994). Seed germination of Mexican podostemaceae. *Aquatic Botany*, 48(2), 145–151. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0304-3770(94)90081-7)
- Tykariska, T. (1982). Rape embryogenesis. IV. Appearance and disappearance of starch during embryo development. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 51(3–4), 381–387. <https://doi.org/10.5586/asbp.1982.035>
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., y Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, 390(6657), 287–289. <https://doi.org/10.1038/36856>
- van der Graaff, E., Laux, T., y Rensing, S. A. (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biology*, 10(12), 248. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-12-248>
- Viudes, S., Burlat, V., y Dunand, C. (2020). Seed mucilage evolution: Diverse molecular mechanisms generate versatile ecological functions for particular environments. *Plant, Cell y Environment*, 43(12), 2857–2870. <https://doi.org/10.1111/pce.13827>
- West, M. A. L., y Harada, J. J. (1993). Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *The Plant Cell*, 5(10), 1361–1369. <https://doi.org/10.2307/3869788>
- Western, T. L., Skinner, D. J., y Haughn, G. W. (2000). Differentiation of Mucilage Secretory Cells of the Arabidopsis Seed Coat. *Plant Physiology*, 122(2), 345–356.
- Yeung, E. (1996). Embryology of *Cymbidium sinense*: Embryo Development. *Annals of Botany*, 78(1), 105–110. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0101>