



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Microsporogénesis y Microgametogénesis de  
*Halodule wrightii* Ascherson, un pasto  
marino del Caribe mexicano.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**IZCHEL ROMANA GOMEZ HERNANDEZ**



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

**COTUTORA:  
DRA. BRIGITTA VAN TUSSENBROEK RIBBINK**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Hojas de Datos del Jurado

### 1. Datos de la alumna

Gómez  
Hernández  
Izchel Romana  
56 58 27 35  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
302121067

### 2. Datos del Tutor

Dra.  
Guadalupe Judith  
Márquez  
Guzmán

### 3. Datos de Cotutor

Dra.  
Brigitta  
van Tussenbroek  
Ribbing

### 4. Datos del sinodal 1

Dra.  
María Guadalupe  
Palomino  
Hasbasch

### 5. Datos del sinodal 2

Dr.  
Antonio  
Lot  
Helgueras

### 6. Datos del sinodal 3

Dra.  
Nelly  
Diego  
Pérez

### 7. Datos del trabajo escrito

Microsporogénesis y Microgametogénesis de *Halodule wrightii* Ascherson, un  
pasto marino del Caribe mexicano.  
82 p  
2011

## **AGRADECIMIENTOS**

### Institucionales

A la Dra. Judith Márquez por haberme apoyado siempre y en todo lo que necesite, invariablemente con gran una sonrisa, entusiasmo, dedicación y amabilidad.

A la Dra. Bigitta van Tussenbroek por haberme brindado su enorme conocimiento del mundo de los pastos marinos y apoyarme tan fantásticamente en campo.

Al M. en C. Ricardo Wong por su gran ayuda en todo el trabajo de laboratorio, por apoyarme en mis dudas y por brindarme su amistad desde el primer día que lo conocí.

A la M. en C. Guadalupe Barba por recibirme tan cariñosamente en Puerto Morelos, por su ayuda en campo y el laboratorio, por su paciencia y amabilidad.

A la M. en C. Mónica Pérez por compartir su trabajo conmigo y por su ayuda incondicional en el laboratorio.

A la M. en C. Karina por las numerosas correcciones y revisiones que me ayudaron a mejorar.

A la Dra. Margarita Collazo y a la Dra. Sonia Vázquez por sus consejos, su ayuda, entusiasmo y cordialidad.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena por su ayuda para tomar las fotografías en microcine.

A la M. en C. Yolanda Homelas por su ayuda con el procesamiento y las fotografías de muestras en MEB.

Al jurado revisor: Dra. Ma. Guadalupe Antonia Palomino Hasbasch, Dr. Antonio Lot Helgueras, Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Nelly Diego Pérez y Dra. Briggitta van Tussenbroek Ribbink, por el tiempo, esfuerzo y comentarios que brindaron a mi tesis.

A la UNAM por brindarme en una educación de calidad y un espacio libre donde desarrollar la ciencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

### Personales

A mis padres por darme la vida, por su cariño, apoyo y confianza.

A mi hermana por ser mi compañera desde la infancia, por sus consejos y regaños.

A mis amigos de la secundaria Alondra, Guillermo y Alejandra quienes me siguen brindando su amistad.

A mis amigas de la prepa Abril, Jazmín y Laura por ser tan divertidas, fieles, afectuosas y buenas amigas.

A mis amigos de la licenciatura Estefania y Jesús quienes me han compartido un pedacito de su vida y sus sueños, y me han apoyado y escuchan incondicionalmente a todas horas.

# ÍNDICE

<b>RESÚMEN</b> -----	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	2
<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>PASTOS MARINOS</b>	
Evolución de los pastos marinos-----	4
Distribución y Ecología-----	6
Taxonomía-----	11
Características de los pastos marinos-----	12
Reproducción de pastos marinos-----	14
<b>CYMODOCEACEAE</b>	
Distribución-----	16
Taxonomía-----	16
Morfología-----	16
<b><i>HALODULE WRIGHTII</i></b>	
Distribución-----	17
Taxonomía-----	17
Morfología-----	18
<b>EMBRIOLOGÍA</b> -----	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b> -----	23
<b>OBJETIVO GENERAL</b> -----	24
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> -----	24
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	
<b>TRABAJO DE CAMPO</b>	
Área de estudio-----	25
Observaciones de campo y colecta de material-----	27

Remoción del Mucílago-----	29
Con enzimas-----	29
Con detergente-----	29
<b>TRABAJO DE LABORATORIO</b>	
Selección de material-----	30
Microtecnica-----	30
Histoquímicas-----	31
Análisis de los haces vasculares-----	31
Microscopia electrónica de barrido-----	32
Microscopia de fluorescencia-----	32
<b>RESULTADOS</b>	
<b>MORFOLOGÍA DE FLOR MASCULINA-----</b>	<b>33</b>
<b>ANATOMÍA DE LA ANTERA</b>	
Desarrollo de la antera-----	36
Microsporogénesis-----	37
Microgametogénesis-----	38
Vascularización de la antera-----	40
<b>GRANOS DE POLEN</b>	
Microestructura del polen-----	49
Estructura del polen en el interior de la antera-----	49
Estructura interna del polen-----	50
<b>DISCUSIÓN-----</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSIONES-----</b>	<b>72</b>
<b>APÉNDICES</b>	
A. Remoción de mucílago con enzimas-----	73
B. Inclusión en LR-White-----	74
C. Inclusión en parafina-----	75
<b>BIBLIOGRAFÍA-----</b>	<b>76</b>

## RESUMEN

*Halodule wrightii* es de uno de los tres pastos marinos más importantes en el Caribe mexicano, junto con *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme* juega un rol fundamental como productor primario en los ecosistemas marinos costeros. Sin embargo, pocos son los trabajos que consideran su biología reproductiva. El estudio del desarrollo de las estructuras reproductoras ayuda a un mejor entendimiento de las adaptaciones de las flores al mar y además aporta caracteres importantes en los estudios filogenéticos de las monocotiledóneas y en el orden Alismatales, al cual pertenecen los pastos marinos. En la presente investigación se estudió el desarrollo de la flor masculina de *H. wrightii*, la cual presenta una morfología muy particular que consta de un androceo conformado por dos anteras tetraesporangiadas fusionadas, envueltas por una bráctea que las cubre por completo. Cuando la flor masculina esta madura, el filamento se alarga hasta que las anteras fusionadas quedan al descubierto sobrepasando la bráctea, listas para la dehiscencia. La microsporogénesis presenta una citocinesis de tipo sucesiva, por lo que las tétradas que se forman son isobilaterales. La pared de la antera esta constituida por epidermis, endotecio, 2 capas medias, y el tapete plasmodial biestratificado. La histoquímica realizada muestra que los granos de polen y el tapete plasmodial presentan polisacáridos insolubles en etapas tempranas e intermedias que, conforme avanza el desarrollo, se van consumiendo; además se observaron proteínas tanto en anteras maduras como intermedias y una gran cantidad de granos de almidón dentro del polen maduro. Al momento de la dehiscencia, el polen es trinucleado y presenta una exina con una delicada ornamentación verrugosa. Dentro de las anteras, el polen alargado forma una masa compacta de granos de polen entrelazados de forma aleatoria; este polen es liberado al medio acuático por las líneas de dehiscencia longitudinales, una en cada teca, cuyo estomio está formado por células de paredes delgadas que permiten la apertura de la antera. Además, en este estudio se muestra, mediante cortes seriados, como los dos haces vasculares, uno de cada antera, se fusionan hacia la parte media de la flor.



## INTRODUCCIÓN

Los pastos marinos son monocotiledóneas acuáticas que se restringen a ambientes marinos pocos profundos. Aunque han sido llamados pastos marinos por la forma cintada de sus hojas, similar a la de los pastos terrestres, no pertenecen a la familia Poaceae. El término “pasto marino”, sin embargo, ha sido ampliamente utilizado en varias lenguas desde mucho tiempo atrás. Probablemente Archerson, 1871 (en Kuo y Den Hartog, 2000) fue el primero en introducir este termino en la literatura científica en su escrito “Die geographische Verbreitung der Seegräser”.

Los pastos marinos son un grupo ecológico de origen polifilético que tienen polinización acuática (hidrófilia) y se concentran dentro de la clase Liliopsida en el orden Alismatales. Se incluyen en 6 familias Zosteraceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae, Hydrocharitaceae, Ruppiaceae (Les *et al.*, 1997) y Potamogetonaceae (Página en red: APwebsiteside, 2008). *Halodule wrightii* se incluye en la familia Cymodoceaceae.

Los pastos marinos constituyen la base de la alta diversidad y productividad de los ecosistemas costeros y estuarinos (Green y Short, 2003; Eklöf *et al.*, 2008). Dentro de sus funciones principales se encuentran: proveer alimento a vertebrados e invertebrados, influir en la biomasa relativa de una gran cantidad de organismos, proveer hábitats a organismos bentónicos y pelágicos, proporcionar criaderos para peces y especies de otros fila; además de ayudar al control de la erosión de las costas al estabilizar los sedimentos y suministrar oxígeno a los sedimentos anóxicos (Stoner, 1980; Thorhaug, 1986; Costanza *et al.*, 1997; Gullström *et al.*, 2002; Heck y Thoman, 1984; Fonseca y Cahalan, 1992; McKenzie *et al.*, 2000).

Los pastos marinos son plantas con reproducción predominantemente clonal; la mayor parte de su crecimiento es a través de la extensión de rizomas. Por mucho tiempo no se

dio importancia a los aspectos de su biología y ecología reproductiva, pero gradualmente este paradigma de la poca importancia de la reproducción sexual de los pastos marinos ha cambiado conforme pasan las décadas (Van Tussenbroek, *et al.* 2009)

Dada la diversidad de funciones que desempeñan los pastos marinos, son pocos los trabajos que se encuentran en la bibliografía sobre el desarrollo de las flores y los órganos reproductivos, por lo que el presente estudio busca contribuir al conocimiento del desarrollo de las flores masculinas de *H. wrightii*, conocimiento útil en programas de manejo y conservación de pastos.

## ANTECEDENTES

### PASTOS MARINOS

#### Evolución de los pastos marinos

La poca importancia que se les ha dado a los pastos marinos en la evolución de las angiospermas desestima la colonización de éstos hacia los hábitats marinos, un notable éxito para un grupo de plantas adaptado a las condiciones terrestres. Un mejor entendimiento de la evolución de los pastos marinos puede proveer señales invaluableles en el conocimiento de las rutas adaptativas en la evolución de las plantas terrestres con flores (Less *et al.*, 1997).

Los pastos marinos tienen un origen polifilético (Cook, 1988). Less y colaboradores (1997) señalan que las angiospermas marinas descienden de por lo menos, tres clados genéticos: Cymodoceaceae, Zosteraceae e Hydrocharitaceae (Fig. 1). Sin embargo a pesar de sus distintos linajes, los pastos marinos exhiben una convergencia morfológica y funcional asociada en gran parte a su invasión dentro del ambiente marino (Van Tussenbroek *et al.*, 2009). Las modificaciones anatómicas y fisiológicas de los pastos marinos, como la dioecia, la fecundación sincronizada (sincronización de la antesis de las flores masculinas y la receptividad de las flores femeninas), la gran producción de polen, los mecanismos de dispersión de polen, entre otros, les ayudan a maximizar las probabilidades de fecundación (Ackerman, 2006; Wilson y Harder 2003; Van Tussenbroek *et al.*, 2008; 2009).

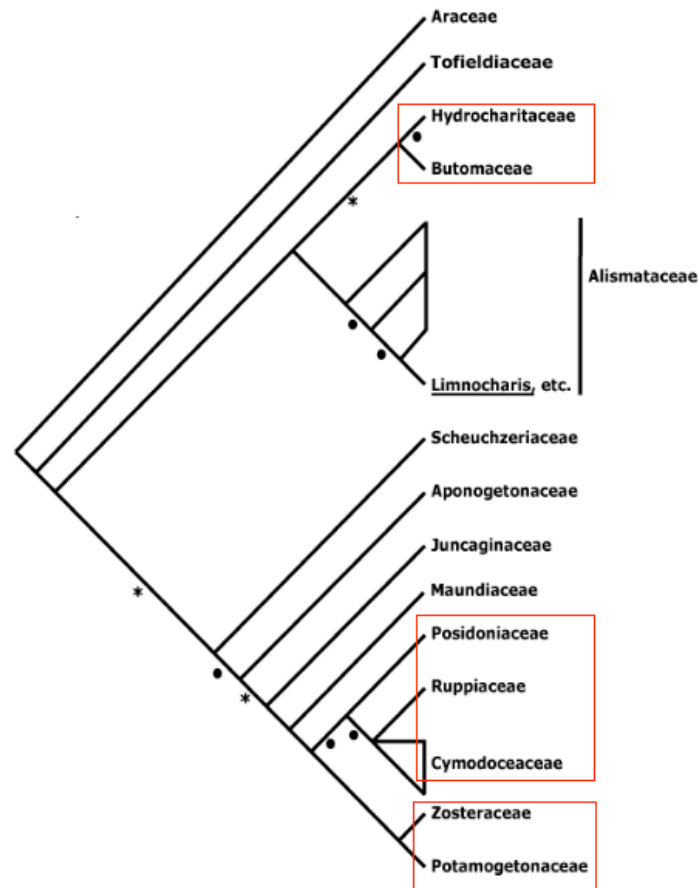


Figura 1. Cladograma de las relaciones filéticas de los Alismatales. Los \* denotan ramificaciones con un respaldo del 50-70%, los • son ramificaciones con menos del 50% de respaldo, las demás ramificaciones tienen un respaldo igual o mayor al 70%. Los cuadros marcan los tres clados en los que se encuentran los pastos marinos (Tomado de Página en red: APwebside, 2008)

Probablemente la condición floral unisexual en los pastos marinos precedió a la hidrofília y a la conquista del medio marino (Les *et al.*, 1997). Las tendencias hacia la polinización acuática y la colonización de ambientes marinos representan la mayor dificultad para la transición de ambientes, sin embargo, aparentemente se correlacionaron y generaron en eventos evolutivos independientes en todas los clados de angiospermas marinas, excepto en *Enhalus acoroides*, en donde la polinización tiene lugar en la superficie del agua (Les *et al.*, 1997).

La hidrofília es un mecanismo abiótico no direccional, en donde el polen es transportado por las corrientes de agua hasta llegar a los estigmas de las flores femeninas (Barrett *et*

al., 1993). La evolución de la hidrofília requiere adaptaciones a la morfología floral terrestre original. La estructura floral de los pastos marinos generalmente presenta pétalos reducidos o falta de un perianto completo (Pettit, 1984). Se cree que los cambios estructurales asociados con la hidrofília son simplemente los productos reducidos de la evolución, a lo largo de diferentes vías adaptativas a los ambientes acuáticos (Pettit y Jermy, 1975).

### Distribución y Ecología

Short y colaboradores (2007) proponen un modelo mundial de 6 bioregiones de distribución y diversidad de los pastos marinos, basado en el conocimiento acerca de las especies de ambientes cálidos *versus* especies de ambientes templados, las restricciones físicas de los océanos, su origen tectónico, y el clima. Las 6 bioregiones geográficas propuestas incluyen el Atlántico Norte Templado, el Atlántico Tropical (en la cual queda incluido el Golfo y Caribe de México), el Mediterráneo, el Pacífico Norte Templado, el Indo-Pacífico Tropical y el Océano Sur Templado (Fig. 2), la distribución mundial de las especies marinas dentro de estas bioregiones se especifica en la tabla 1.

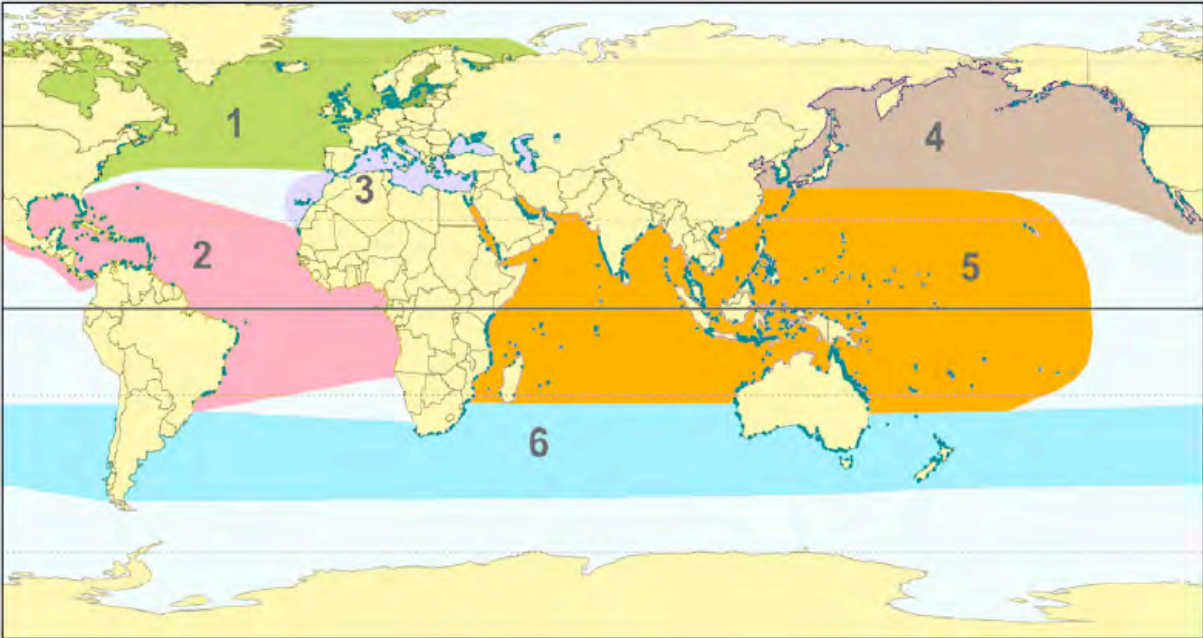


Figura 2. Distribución mundial de los pastos marinos. Los puntos azules muestran las áreas donde se distribuyen los pastos marinos y los polígonos las bioregiones geográficas: 1. Atlántico Norte Templado; 2. Atlántico Tropical; 3. Mediterráneo; 4. Pacífico Norte Templado; 5. Indo-Pacífico Tropical; 6. Océano Sur Templado (Tomado de Short *et al.*, 2007)

Tabla 1. Especies de cada bioregión

Bioregión	Descripción	Especies
1. Atlántico Norte Templado (del Norte de Carolina, USA a Portugal)	Baja diversidad de pastos marinos templados (5 especies) principalmente en estuarios y lagunas.	<i>Ruppia maritima</i> , <i>Zostera marina</i> , <i>Zostera noltii</i> , <i>Cymodocea nodosa</i> +, <i>Halodule wrightii</i> +
2. Atlántico Tropical (incluye el mar del Caribe, el Golfo de México, Bermudas, las Bahamas y ambas costas tropicales del Atlántico)	Alta diversidad de pastos marinos tropicales (10 especies) que crecen en la parte posterior de los arrecifes y en los bancos de poca profundidad de aguas claras.	<i>Halodule beaudettei</i> , <i>H. wrightii</i> ( <i>H. bermudensis</i> , <i>H. emarginata</i> ), <i>Halophila baillonii</i> , <i>Halophila decipiens</i> , <i>Halophila engelmanni</i> , <i>Halophila johnsonii</i> , <i>R. maritima</i> , <i>Syringodium filiforme</i> , <i>Thalassia testudinum</i> , <i>Halophila stipulacea</i> +

3. Mediterráneo (incluye el mar Mediterráneo, el Negro, el Caspio, el Aral y el noroeste de África)	Vasta praderas profundas de moderada diversidad y una mezcla de pastos marinos tropicales/templados (9 especies) que crecen en aguas claras.	<i>C. nodosa</i> , <i>Posidonia oceanica</i> , <i>Ruppia cirrhosa</i> , <i>R. maritima</i> , <i>Z. marina</i> , <i>Z. noltii</i> , <i>H. wrightii+</i> , <i>H. decipiens+</i> , <i>H. stipulacea+</i>
4. Pacífico Norte Templado (de Corea a Baja California, México)	Alta diversidad de pastos marinos templados (15 especies) en estuarios, lagunas y zonas costeras superficiales.	<i>Phyllospadix iwatensis</i> , <i>Phyllospadix japonicus</i> , <i>Phyllospadix scouleri</i> , <i>Phyllospadix serrulatus</i> , <i>Phyllospadix torreyi</i> , <i>R. maritima</i> , <i>Zostera asiatica</i> , <i>Zostera caespitosa</i> , <i>Zostera caulescens</i> , <i>Zostera japonica</i> , <i>Z. marina</i> , <i>H. wrightii+</i> , <i>H. decipiens+</i> , <i>Halophila euphlebica+</i> , <i>Halophila ovalis+</i>
5. Indo-Pacífico Tropical (Este de África, sur de Asia y Australia tropical hasta el este del Pacífico )	La más alta y numerosa diversidad bioregional; pastos marinos tropicales (24 especies) predominantemente en plataformas de arrecifes aun que también en agua profundas, muy comúnmente pastoreadas por mega-herbívoros.	<i>Cymodocea angustata</i> , <i>Cymodocea rotundata</i> , <i>Cymodocea serrulata</i> , <i>Enhalus acoroides</i> , <i>Halodule pinifolia</i> , <i>Halodule uninervis</i> , <i>H. wrightii</i> , <i>Halophila beccarii</i> , <i>Halophila capricorni</i> , <i>H. decipiens</i> , <i>Halophila hawaiiiana</i> , <i>Halophila minor</i> , <i>H. ovalis</i> , <i>Halophila ovata</i> , <i>Halophila spinulosa</i> , <i>H. stipulacea</i> , <i>Halophila tricostata</i> , <i>R. maritima</i> , <i>Syringodium isoetifolium</i> , <i>Thalassia hemprichii</i> , <i>Thalassodendron ciliatum</i> , <i>Zostera capensis+</i> , <i>Z. japonica+</i> , <i>Zostera muelleri+</i> [ <i>Zostera capricorni</i> ]

6. Océano Sur Templado (Nueva Zelanda y Australia templada, sur de América y sur de África)	Extensas praderas de baja a alta diversidad de pastos marinos templados (18 especies) frecuentemente creciendo bajo condiciones extremas.	<i>Amphibolis antarctica</i> , <i>Amphibolis griffithii</i> , <i>Halophila australis</i> , <i>Posidonia angustifolia</i> , <i>Posidonia australis</i> , <i>Posidonia ostenfeldii</i> complejo, <i>Posidonia sinuosa</i> , <i>R. maritima</i> , <i>Ruppia megacarpa</i> , <i>Ruppia tuberosa</i> , <i>Thalassodendron pachyrhizum</i> , <i>Z. capensis</i> , <i>Z. muelleri</i> [ <i>Z. capricorni</i> ], <i>Zostera tasmanica</i> [ <i>Heterozostera tasmanica</i> ], <i>H. decipiens</i> +, <i>H. ovalis</i> +, <i>S. isoetifolium</i> +, <i>T. ciliatum</i> +
---	---	---

Se muestran los límites de cada bioregión, su descripción y las especies de pastos marinos de cada bioregión, las cuales se presentan en orden alfabético seguido por las especies que tienen su centro de distribución en una bioregión adyacente o son invasivos a la bioregión, designados con un "+". Las especies listadas entre [] son conespecíficas con la especie precedente. Las especies listadas en () requieren más investigación genética y morfométrica y pueden ser conespecíficas con la especie precedente (Tomado de Short *et al.*, 2007).

El Atlántico tropical, cuenta con 10 especies de pastos marinos. En México están representados 6 géneros, que incluyen de 9 a 11 especies (según la clasificación utilizada), es decir, el 50% de los géneros y aproximadamente el 13% de las especies de plantas vasculares marinas del mundo. El Caribe cuenta con 8 especies, siendo las más comunes (en orden de importancia) *Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme* y *Halodule wrightii* (Página en red: Marine Seagrasses, 2009), mismas que pueden existir en praderas de una sola especie aunque más frecuentemente se encuentran entremezclados con otras especies o secuencialmente en sucesión ecológica (Creed *et al.*, 2003). *Halophila engelmanni* también ha sido reportada al norte del Caribe y en el Golfo de México (Green and Short, 2003), así como otras especies de *Halodule* (por ejemplo, *Halodule bermudensis* y *H. beaudettei*), pero su ubicación taxonómica aún es



incierto. La región tiene predominantemente un ambiente carbonatado, ocupando áreas desde los arrecifes de poca profundidad hasta los amplios bancos de arena profundos. *T. testudinum* y *S. filiforme* han sido reportados en profundidades de hasta 20 m, mientras *Halophila decipiens* crece hasta los 50 m de profundidad. Manatíes y tortugas marinas son los grandes herbívoros de los pastos marinos en esta región, aunque también erizos, peces y crustáceos se alimentan de estas plantas (Short *et al.*, 2007) (Fig. 3).

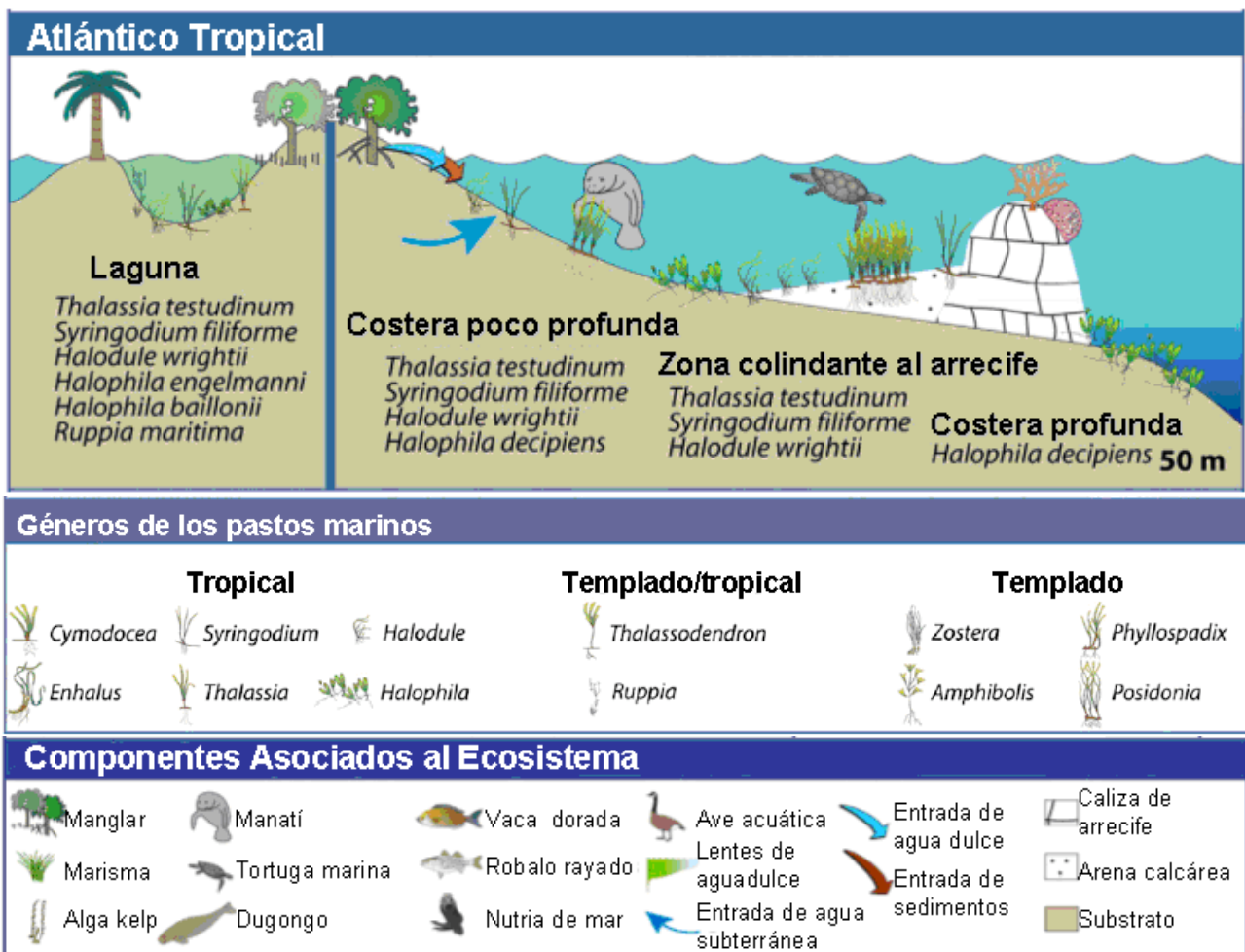


Figura 3. Diagrama conceptual del hábitat de los pastos marinos del Atlántico Tropical (Tomado de Short *et al.*, 2007)

El rango de profundidad de los pastos marinos está determinado en gran parte por la disponibilidad de luz para la fotosíntesis en el límite inferior y por la exposición al aire u oleaje en el límite superior. Su distribución además está influenciada por la acción del oleaje, la turbidez del agua y la baja salinidad por el flujo de agua dulce. Las praderas

marinas persisten en la zona intermareal, especialmente en lugares protegidos del oleaje o cuando existen trampas de agua durante la marea baja, por ejemplo plataformas de arrecifes y piscinas naturales (McKenzie y Campbell, 2002).

La complejidad del hábitat en las praderas de pastos marinos aumenta la diversidad y abundancia de los animales. Las altas tasas de producción primaria de los pastos marinos están estrechamente vinculadas con la producción pesquera. Estas plantas mantienen numerosos herbívoros y detritívoros que sirven de alimento para los siguientes niveles tróficos. Las praderas de pastos marinos/algas se clasifican como el tercer ecosistema más valioso a nivel mundial (en una base por hectárea), sólo precedido por los estuarios y humedales (Costanza *et al.* 1997).

La pérdida y destrucción de las praderas de pastos marino se ha reportado en la mayor parte del mundo (Short y Wyllie-Echeverría 1996; Larkum *et al.*, 2006), a veces por causas naturales, como terremotos, lluvias torrenciales, tormentas, huracanes y el sobre pastoreo (den Hartog, 1987; Poiner *et al.*, 1989; Eklöf *et al.*, 2008). Actualmente es más común la pérdida de praderas de pastos por la destrucción relacionada con las actividades humanas, por ejemplo, como consecuencia de la eutroficación, cambios en el uso de suelo (Cambridge y McComb, 1984; Coles *et al.*, 2003), el dragado, el desarrollo de la costa, los daños asociados a la sobreexplotación de los recursos costeros y las actividades recreativas en bote (Short y Wyllie-Echeverría, 1996).

### Taxonomía

En el mundo existen 12 géneros de pastos marinos con aproximadamente 72 especies (Short *et al.*, 2011), distribuidos en las familias: Cymodoceaceae, Posidoniaceae, Zosteraceae que contienen géneros exclusivos de ambientes marinos (Den Hartog, 1970;

Kuo y Den Hartog, 2000)- e Hydrocharitaceae que contiene 3 géneros marinos y 14 de agua dulce (Sculthorpe, 1985)-. Algunos autores incluyen ciertas especies de Ruppiaceae y Zannichelaceae (Kuo y Den Hartog, 2000; Green y Short, 2003; Den Hartog y Kuo, 2006; Van Tussenbroek *et al.*, 2009). La APG III considera a Zannichelaceae dentro de la familia Potamogetonaceae (Fig. 4).

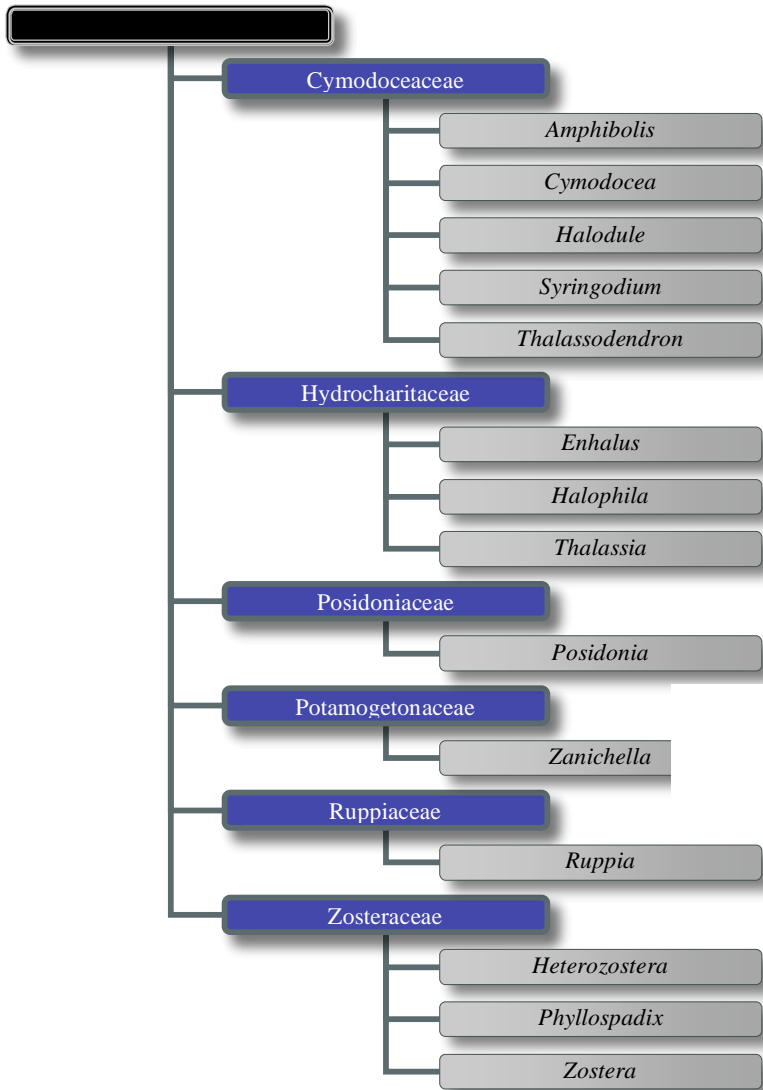


Figura 4. Clasificación de familias en el orden Alismatales perteneciente al grupo ecológico de los pastos marinos

### Características de los pastos marinos

Los pastos marinos están conformados por un rizoma herbáceo cilíndrico y rastrero, enterrado en la arena con raíces secundarias, raíces adventicias y pelos radiculares,

estas raíces presentan epidermis con tejido parenquimatoso y aerénquima, que guarda aire entre las células y facilita la aireación del tejido (Kuo y McComb, 1989). Las raíces varían en tamaño, grosor, pilosidad y patrón de ramificación.

Los rizomas de los pastos marinos pueden ser leñosos y robustos (p.e., *Thalassia*), delgados y resistentes (p.e., *Syringodium*) o delicados (p.e., *Halophila*). El rizoma se desarrolla mediante el crecimiento de su ápice, formando también ejes verticales (haces) de donde se originan las hojas y flores. Los tallos y sus hojas verdes son las partes más visibles de los pastos marinos. Las hojas tienen forma de cinta (p.e., *Thalassia*), o son cilíndricas (p.e., *Syringodium*), con una base semitransparente envainada, que sirve como protección de los tejidos en desarrollo. Una vez muerta la vaina puede resistir como tejido fibroso (p.e., *Thalassia*). Las especies de *Halophila* tienen hojas ovaladas, fijas al rizoma por medio de un pecíolo que presenta escamas en su base (Van Tussenbroek *et al.*, 2010; Fig. 5).

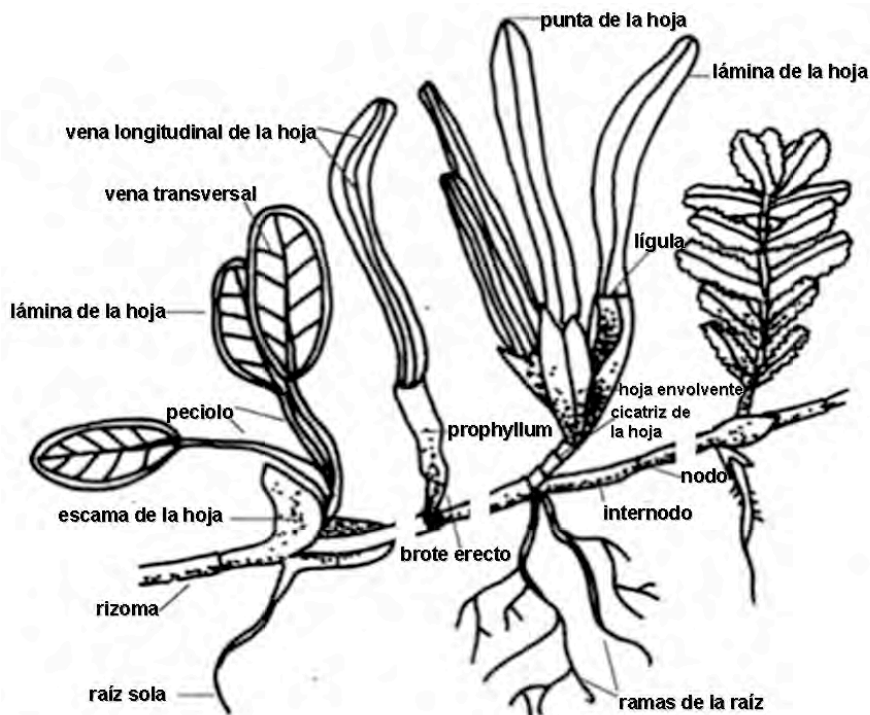


Figura 5. Características generales de las partes vegetativas de los pastos marinos (Tomado de Lanyon, 1986)

Las propiedades indispensables que un pasto marino tiene que presentar para poder sobrevivir en el medio marino son: (1) Estar adaptado a la vida en agua salina; (2) Ser capaz de crecer completamente sumergido; (3) Estar firmemente anclado con rizomas o "holdfasts" para resistir la acción de las olas, las mareas y corrientes; (4) Tener un mecanismo de polinización hidrófila (Arber, 1920) y (5) Ser capaz de competir exitosamente en el medio marino (Kuo y Den Hartog, 2000).

### Reproducción de pastos marinos

Van Tussenbroek y colaboradores (2009) señalan que los pastos marinos son plantas altamente clonales y su floración ha sido considerada, por largo tiempo, una característica más que las distingue de las algas marinas, el grupo más conocido de las macrófitas marinas (Lobban y Harrison, 1997). El rol de la reproducción sexual para la supervivencia y para el mantenimiento de las poblaciones ha sido considerado como de importancia secundaria en relación con la reproducción clonal (Sculthorpe, 1985; Philbrick y Less, 1996). La recolonización dentro de los parches perturbados de praderas de pastos marinos generalmente ocurre mediante la extensión de rizomas, los cuales bordean estos parches (Clark y Kirkman, 1989; Williams, 1990). La dinámica de la comunidad de las poblaciones de pastos marinos, en cortos intervalos de tiempo, a menudo puede explicarse por la reproducción asexual.

Los patrones de crecimiento asexual en las plantas clonales pueden ser evaluados por la distancia entre clones, los patrones de ramificación y la presencia-ausencia de meristemas latentes. Para que el crecimiento clonal pueda mantenerse es necesario conservar continuamente la actividad meristemática de los brotes (Tomlinson, 1974). Van Tussenbroek y colaboradores (2000) estudiaron la latencia y regulación foliar en *Thalassia testudinum* y encontraron que el esparcimiento de los nuevos rametos es

regulado generalmente por la densidad de los brotes, el desarrollo foliar de muchos brotes es inhibido cuando existe un alto grado de hacinamiento, evitando así la sobreproducción de brotes foliares. Este mecanismo de regulación de la densidad de brotes foliares ayuda a mantener la dominancia de *T. testudinum* sobre otras especies y se asemeja al de la inhibición del desarrollo de brotes de algunas plantas clonales terrestres (por ejemplo, Noble *et al.*, 1979; Hartnett y Bazzaz, 1985; De Kroon y Kwant, 1991). Se ha observado que la extensión de *T. testudinum* es completamente dependiente del crecimiento del rizoma horizontal subterráneo (Tomlinson, 1974), por lo que la activación de los meristemas apicales del rizoma horizontal tiene consecuencias de mayor alcance que el de la latencia de los tallos, ya que llevan a la propagación vegetativa. Se cree que este mecanismo o mecanismos similares pueden ocurrir en otros pastos marinos como *Cymodocea nodosa* (Van Tussenbroek *et al.*, 2000).

Less (1988) menciona que la ineficiencia en la transferencia del polen, la reducción de la sexualidad, el crecimiento clonal generalizado y la reducida producción de semillas en hidrófitas puede reflejar el cambio de adaptación importante hacia la asexualidad como medio de preservar complejos de genes de adaptación estable en ambientes acuáticos. Sin embargo este paradigma de la poca importancia de la reproducción sexual en los pastos marinos ha cambiado en la última década. El desarrollado de marcadores genéticos altamente polimórficos, han revelado que las poblaciones de pastos marinos pueden ser genéticamente muy variables (Waycott *et al.*, 2006). En resumen, la reproducción sexual es importante a largo plazo para la estabilidad genética de las poblaciones y especies, así como para la recolonización después de disturbios importantes y para mantener el flujo de genes entre las poblaciones (Van Tussenbroek *et al.*, 2008).

## CYMODOCEACEAE

### Distribución

A excepción de *Amphibolis*, que se encuentra limitada a agua australianas, los géneros de la familia Cymodoceaceae se localizan en mares tropicales, sub-tropicales y a veces hasta aguas cálido-templadas. Dentro del mar están distribuidos en las zonas poco profundas intermareales y partes superiores de la zona submareal en sustratos de arena y lodo en donde pueden quedar expuestas o protegidas del agua (Green y Short, 2003). Pueden ocurrir en sistemas de arrecifes de corales, costas protegidas someras, estuarios y en manglares pantanosos (Phillips y Meñez, 1988).

### Taxonomía

La familia Cymodoceaceae incluye 5 géneros y aproximadamente 16 especies aun en discusión. Los géneros son *Amphibolis*, *Cymodocea*, *Halodule*, *Syringodium* y *Thalassodendron* (Página en red: Royal Botanical Garden Kew, 2010).

### Morfología

De manera general la familia presenta hojas lanceoladas (con excepción de *Syringodium* spp. que presenta hojas cilíndricas) que contienen taninos, rizomas rastreros, herbáceos, monopodiales (*Syringodium*, *Halodule* y *Cymodocea*), o lignificados, simpodiales (*Thalassodendrom* y *Amphibolis*) y raíces en los internodos (Den Hartog, 1970).

Son plantas dioicas con las flores envueltas en brácteas, arregladas en inflorescencias (*Syringodium*) o solitarias (*Cymodocea*, *Halodule*, *Amphibolis*, *Thallasodendron*). Las flores masculinas consisten en dos anteras unidas en la base (Den Hartog, 1970).

### HALODULE WRIGHTII

#### Distribución

*H. wrightii* se encuentra distribuida en partes del Atlántico, Pacífico Oriental e Índico subtropical (Van Tussenbroek *et al.*, 2010) (Fig. 6). Las poblaciones se han encontrado del intermareal hasta 8 a 12m de profundidad (Phillips y Meñez, 1988).



Figura 6. Distribución mundial de *Halodule wrightii* Ascherson. El área sombreada corresponde a 2 625 000 Km<sup>2</sup>, aun que, actualmente la distribución de la especie es mucho menor (Tomado de Green y Short, 2003)

#### Taxonomía

La taxonomía del género *Halodule* no es muy clara, debido a la falta de trabajos y a que muchas de las especies se utilizan como sinónimos en diferentes partes del mundo. Las



especies son diferenciadas considerando pocos aspectos como el ancho de la hoja, la morfología del ápice de la hoja, y la presencia o ausencia de lagunas en torno a la vena media. Sin embargo Phillips (1967) encontró que las hojas de *Halodule wrightii* pueden variar ampliamente en la misma planta y también en ambientes diferentes.

El género *Halodule* contiene 3 especies según Phillips y Meñez (1988): *H. pinifolia*, *H. uninervis* y *H. wrightii*. Según Den Hartog (1970) y Kew Royal Botanic Garden (2010) existen 6 especies: *H. pinifolia*, *H. uninervis*, *H. wrightii*, *H. bermudensis*, *H. beaudettei* y *H. ciliata*. Short y colaboradores (2011) distinguen 11 especies: *H. pinifolia*, *H. uninervis*, *H. wrightii*, *H. bermudensis*, *H. beaudettei*, *H. ciliata*, *H. australis*, *H. brasiliensis*, *H. tridentata*, *H. lillianeae* y *H. emarginata*.

### Morfología

Los tallos, con 2 a 4 hojas surgen de rizomas verticales. Los rizomas son delgados, blancos o ligeramente pardos, con líneas delgadas en la base de los haces de color café. Las láminas de las hojas son en forma de cinta, con un largo de entre 2 y 5 mm. Su vaina en la base es semitransparente. El ápice de la hoja tiene dos pequeños dientes laterales y a veces un diente mediano pequeño. Los rizomas horizontales dan lugar a las raíces y terminan en un haz foliar. Las raíces, sin ramificaciones son blancas, rosadas o grisáceas, terminando en un punto obscuro. La planta se ramifica de escasa a moderadamente. Las flores son solitarias y muy sencillas. La flor masculina esta compuesta por dos anteras fusionadas y la flor femenina consiste en un par de ovarios pequeños en la base del haz, cada uno con un largo estigma. Las semillas maduras son negras con cubierta seminal dura, y forman un banco en el sedimento marino (Van Tussenbroek *et al.*, 2010; Fig. 7).

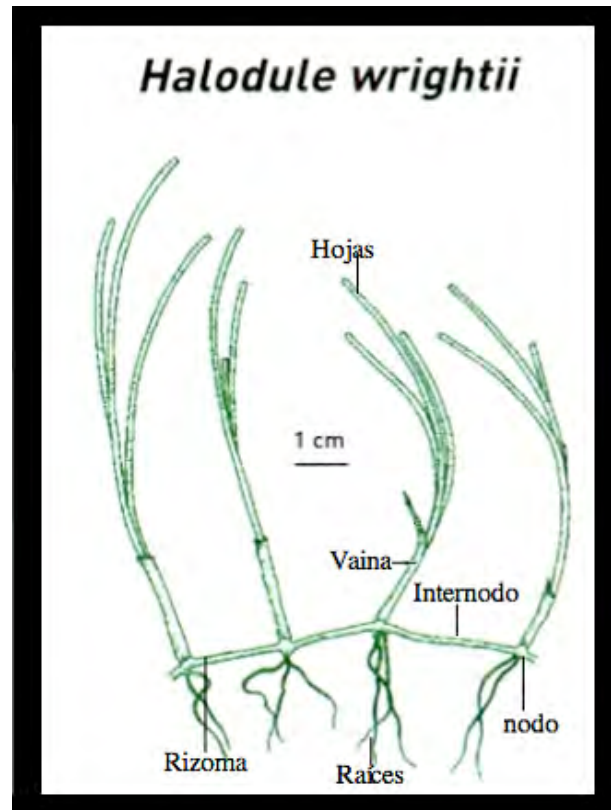


Figura 7. Morfología vegetativa de *Halodule wrightii* (Tomado de Green y Short, 2003)

## EMBRIOLOGÍA

En general, la biología reproductiva de los pastos marinos esta pobremente estudiada, especialmente por la dificultad del trabajo en campo y porque las flores son muy reducidas. Sobre Cymodoceaceae existen pocos trabajos y destacan los de Pettitt y Jermy (1975) sobre la estructura de la pared del polen de *Halodule wrightii*, Yamashita (1976) sobre la formación del polen de *Halodule pinifolia* y *Halodule uninervis*, Thomlinson y Posluszny (1978) sobre la morfología floral y el desarrollo de las flores masculinas y femeninas de *Syringodium filiforme*, Ducker y colaboradores (1978) sobre el desarrollo del polen y la polinización submarina de *Thalassodendron ciliatum* y *Amphibolis antarctica*, Pettitt (1981) sobre el desarrollo del polen en *Thalassodendron ciliatum* y Pérez (2010) quien estudió la ultraestructura de *Halodule wrightii* y *Syringodium filiforme*.

Sobre el género *Halodule* hay aun menos trabajos. Únicamente la investigación de Yamashita (1976) trata de la embriología de este género; en él se describe la formación del polen de *H. uninervis* y *H. pinifolia*. Menciona que no se encuentran diferencias esenciales entre ambas especies pues las dos presentan células madres de las microsporas elípticas, microsporogénesis de tipo sucesiva con formación de tétradas isobilaterales, tapete plasmodial monoestratificado que se rompe antes de que comience la meiosis, granos de polen maduros filiformes y trinucleados (Fig. 8).

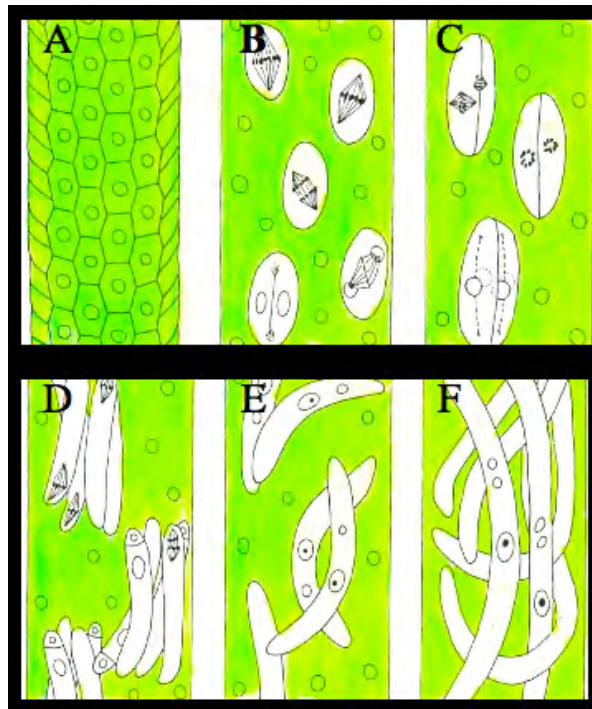


Figura 8. Esquema de la microsporogénesis de *Halodule uninervis* y *H. pinifolia* A) Células arquesporales rodeadas por una fila de células del tapete. B) Meiosis I células madres del polen rodeadas por el tapete plasmodial. C) Meiosis II tétradas jóvenes rodeadas por un tapete plasmodial. D) Etapa de espora joven en división mitótica en un estado temprano bicelular. E) Grano binucleado. F) Grano filiforme trinucleado en antera madura (Tomado de Yamashita, 1976)

Sobre *H. wrightii* existen 2 trabajos que describen el polen, el primero es el de Pettitt y Jermy (1975), quienes presentan la morfología filiforme del grano de polen, mencionan que la pared del grano de polen presenta una exina delgada, sin ornamentación, ni estructura y la intina esta formada por una capa masiva en la pared del polen. También señalan que dentro de la tétrada de microsporas se forma una delgada capa de calosa, y

entre esta y la membrana de la espora se deposita una capa delgada de calosa llamada primexina (Fig. 9). El otro trabajo es el de Pérez (2010) en el que estudia la ultraestructura del polen y menciona que la pared del grano de polen esta conformada por tres estratos, uno de la exina y dos de la intina. El estrato de la exina esta formado por la ectexina (la capa más externa), la cual no es continua y esta constituida de ornamentaciones en forma de verrugas. Los dos estratos de la intina son continuos: el primero, la exintina es una capa electrodensa (que se observa oscura al MET) y fibrosa; y el segundo, la endintina es una capa electrotransparente (que se observa clara al MET) que no presenta fibras (Fig. 10).

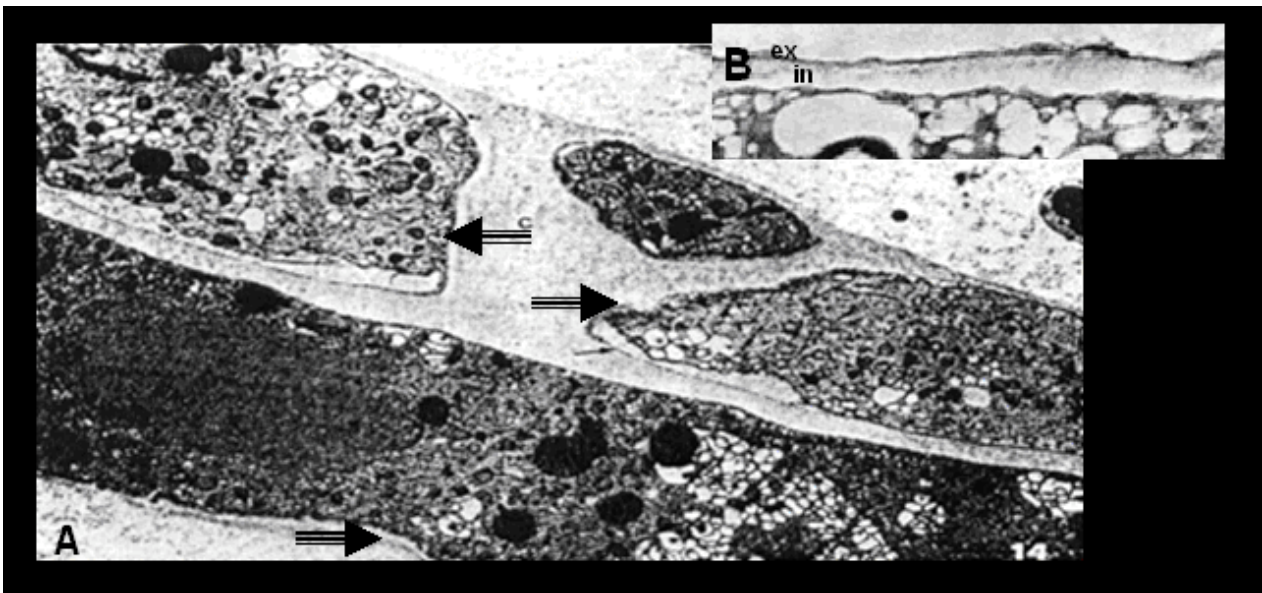


Figura 9. Grano de polen de *Halodule wrightii* A) Granos filiformes (flechas). B) Acercamiento de la pared del grano de polen. ex-exina, in-intina (Tomado de Pettit y Jeremy, 1975)

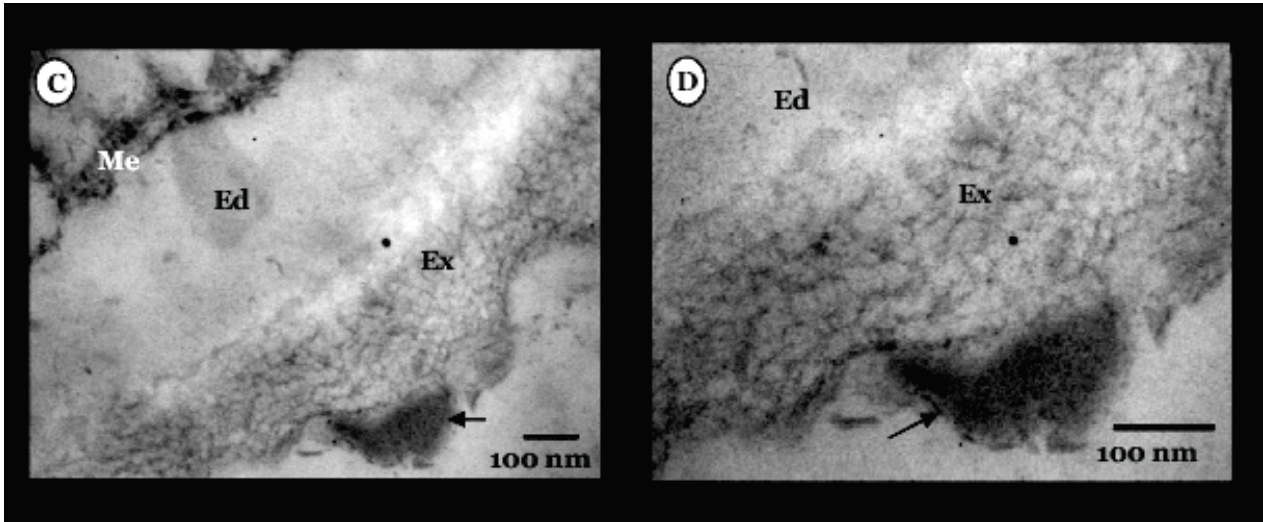


Figura 10. C y D. Pared del grano de polen de *Halodule wrightii* en donde se observa una membrana rodeada por una capa de endintina y de exintina y sobre esta capa se deposita ectexina de manera discontinua en forma de verrugas (flecha). Ed= endintina, Ex= exintina, Me=membrana. (Tomado de Pérez,

2010)

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la dificultad que representa hallar las flores porque son inconspicuas y efímeras, el conocimiento que se tiene acerca de su biología reproductiva y embriología es mínimo, además de ser necesario tener un conocimiento previo de su fenología, para su recolecta. *Halodule wrightii* es una de las tres principales especies que conforman el hábitat de los pastos marinos en el Caribe mexicano. Estudiar su biología reproductiva y desarrollo de estructuras reproductoras nos ayudará a conocer las adaptaciones a la polinización acuática y a tener un mejor enfoque de la relación evolutiva que guarda con otros pastos marinos y angiospermas en general.

## OBJETIVO GENERAL

✚ Conocer y describir el desarrollo de las estructuras reproductivas de la planta masculina de *Halodule wrightii*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Describir la microsporogénesis y microgametogénesis.
- ✚ Describir el desarrollo de la pared de la antera.
- ✚ Describir la micromorfología de los granos de polen.
- ✚ Describir la estructura interna del polen.
- ✚ Describir el acomodo de los granos de polen en la antera.
- ✚ Describir la antesis.
- ✚ Determinar el punto de separación de los haces vasculares correspondientes a las dos anteras fusionadas.

## **METODOLOGÍA**

### TRABAJO DE CAMPO

#### Área de estudio

El trabajo de campo se llevó a cabo en Puerto Morelos en el estado de Quintana Roo, México. El Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos forma parte de la barrera arrecifal denominada “Gran Cinturón de Arrecifes del Atlántico Occidental”, la segunda barrera arrecifal más grande del mundo. Sus coordenadas geográficas son 21°00'00" y 20°48'33" latitud norte y 86°53'14.40" y 86°46'38.94" longitud oeste (Página en red: CONANP, 2010).

El trabajo de selección y limpieza de las muestras se llevó a cabo en la unidad académica de Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la UNAM. Las muestras fueron obtenidas durante el mes de Marzo del 2005 y en Noviembre del 2009, de la pradera de pastos marinos que se encuentran frente a la unidad académica a una distancia de entre 3 y 10 metros de la línea de costa (Fig. 11).



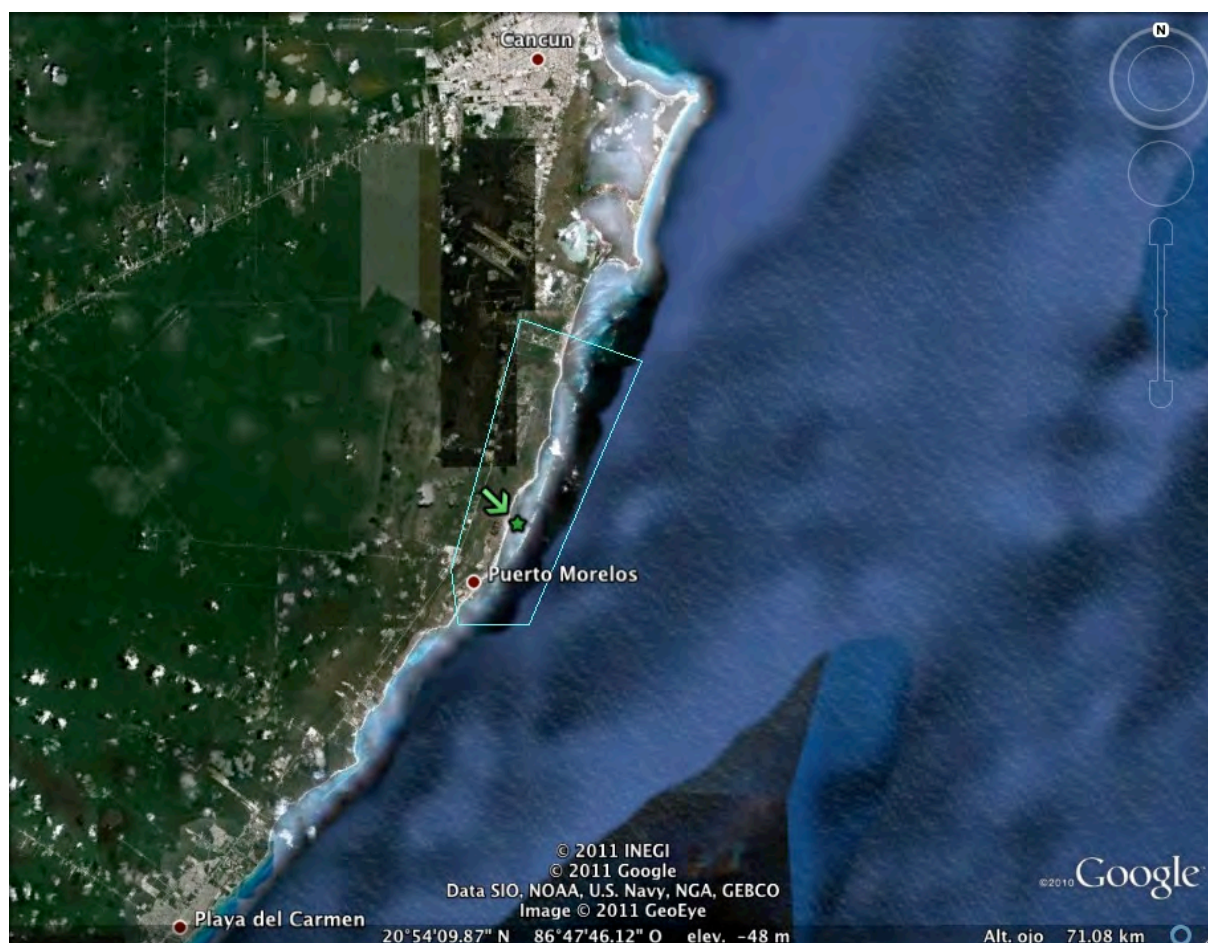


Figura 11. Mapa de localización de Puerto Morelos. La flecha corresponde al sitio de recolectas de muestras y el polígono al Parque Nacional Arrecife Puerto Morelos

## Observaciones de campo y colecta de material

*Halodule wrightii* es una planta frecuente a lo largo de la franja costera de Puerto Morelos, Quintana Roo. Los parches de pradera de donde se obtuvieron las muestras son mono o multiespecíficas, en ocasiones entremezcladas con *Syringodium filiforme*. Los parches y manchones discontinuos están constituidos por plantas femeninas, masculinas o ambas. Los manchones se localizan a una distancia de aproximadamente 1-20 metros mar adentro desde la línea de costa, a una profundidad de entre 0.3 m hasta 2 m. Encontrar las flores masculinas es sumamente complicado en campo por el tamaño tan pequeño de las flores (de 1 – 11 mm) y por que están cubiertas por hojas del tallo vegetativo hasta su dehiscencia. Solo están expuestas horas antes y después de la antesis (Fig. 12). Por esta razón se recolectaron cuadrantes pequeños (de aproximadamente 80 cm<sup>2</sup>) de plantas completas, incluyendo las estructuras subterráneas tales como rizomas y raíces. Para este fin se utilizó un cuchillo con lámina de aprox. 30 cm, para cortar un círculo aproximado de 10 cm de diámetro y posteriormente remover las plantas con el sedimento. Las muestras se colocaron en una cubeta con agua de mar y una bomba para suministro de aire y se preservaron las muestras *in vivo* a una temperatura a aprox. 24° C con luz ambiental. Se procesaron las muestras dentro de 3-4 días de la recolecta, analizando todas las haces foliares bajo un microscopio estereoscópico, separando las flores masculinas en distintas etapas de desarrollo. La mayoría de estas flores se fijaron en FAA (formol, ácido acético, etanol al 96% y agua: 10:5:50:35) para su posterior procesamiento en el laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM y la otra parte de las flores se procesó *in fresco* para remover el mucílago que recubre al polen.

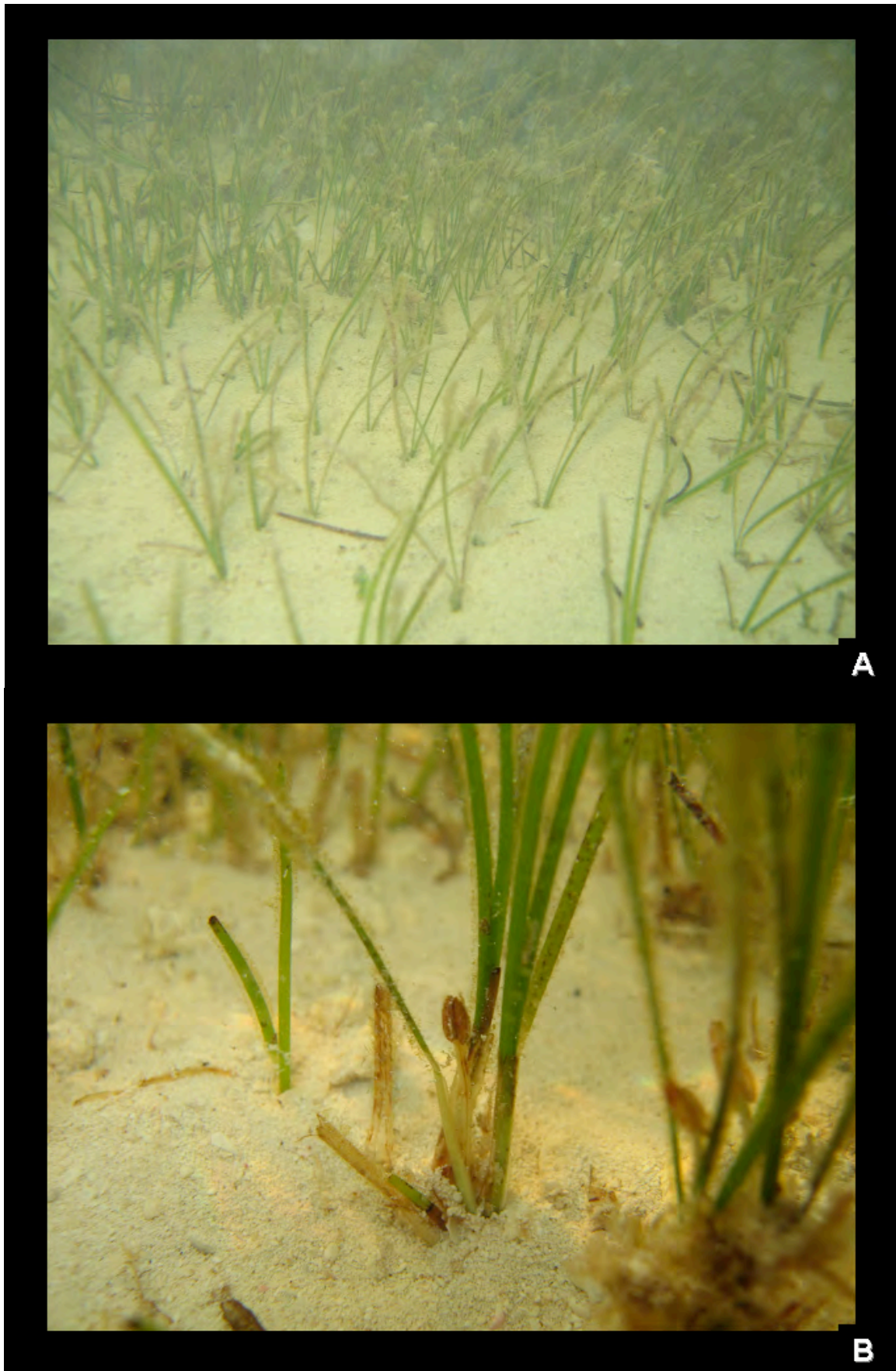


Figura 12. A) Pradera de *Halodule wrightii*; B) Flor después de la dehiscencia de *H. wrightii* (Tomadas por Ricardo Wong)

## Remoción de mucílago

Con el fin de remover el mucílago del polen para observar si este presentaba ornamentación se utilizaron dos procedimientos:

### Con enzimas

Se colocaron anteras fijadas en formaldehído-alcohol-ácido acético (FAA) en dos complejos enzimáticos, el primero incluía celulasa-pectinasa y el segundo Celulasa-glucosidasa-carboximetil celulasa – glucosidasa – xilanasa), las muestras con cada complejos enzimáticos se incubaron, se enjuagaron y se procesaron para el microscopio electrónico de barrido (MEB). El protocolo detallado se describe en el apéndice A.

### Con detergente

Se prepararon seis mezclas con detergente Nonidet (tabla 2) en las cuales se colocaron anteras frescas de entre 6 a 8 mm en agitadoras por 12 hrs. Estas muestras se mantuvieron en las diferentes soluciones de Nonidet por 1 mes y posteriormente se observaron en MEB.

Tabla 2. Mezclas con detergente

Mezcla	Agua de mar (en ml)	Nonidet (en ml)
1	7	3
2	8	2
3	9	1
4	9.9	0.1
5	10	1
6	14	1

## TRABAJO DE LABORATORIO

### Selección del material

Un primer criterio para la selección del material fue separar las flores de *Halodule wrightii* por el largo de las anteras utilizando los siguientes intervalos para determinar cada etapa:

Tabla 3. Etapas de desarrollo de la antera de *Halodule wrightii* con sus medidas correspondientes.

Etapa	Longitud de la antera (mm)
1	1.0 - 2.0
2	2.1 - 3.0
3	3.1 - 4.0
4	4.1 - 5.0
5	5.1 - 6.0
6	6.1 - 7.0
7	7.1 - 8.0

Recolectado en Puerto Morelos en Marzo 2005 y Noviembre 2009

### Microtecnica

Las anteras se procesaron con técnicas convencionales de histoquímica para las cuales se incluyeron las flores en paraplast. Para describir el desarrollo y la vascularización de la antera, las flores se incluyeron en resina de LR-White y se tiñieron con azul de anilina.

Las dos técnicas de inclusión fueron empleadas según el manual de López-Curto y colaboradores (2005) y se describe en el apéndice B y C.

## Histoquímica

Se realizaron las siguientes tinciones para identificar diferentes tipos de compuestos:

- Ácido Peryódico-Reactivo de Schiff (APS) (para identificar polisacáridos insolubles). Las muestras se hidrataron hasta agua, se les aplicó ácido peryódico durante 15 minutos y se enjuagaron en agua. Después se les aplicó reactivo de Schiff durante 25 minutos y se volvieron a enjuagar con agua, posteriormente se lavaron con ácido acético al 2% durante 1 minuto para evitar la formación de cristales, se enjuagaron con agua y se deshidrataron hasta xilol. Se montaron con resina y se observaron al microscopio.
- Lugol (Identifica granos de almidón). Las muestras se hidrataron hasta agua y se les aplicó lugol por 5 minutos, se enjuagaron y se observaron al microscopio ya que la preparación es temporal.
- Azul negro de Naftol (Identifica proteínas). Las muestras se deshidrataron hasta etanol 50%, se les aplicó azul negro de naftol durante 5 minutos, se enjuagaron con butanol y se pusieron en xilol por 3 minutos. Se montaron en resina y se observaron al microscopio.

## Análisis de los haces vasculares

Se obtuvieron cortes seriados de 2  $\mu\text{m}$  de espesor de anteras jóvenes, intermedias y maduras incluidas en LR-White. Estos cortes se analizaron bajo microscopio óptico para determinar el acomodo y fusión de los haces vasculares en las anteras. Se hizo una selección de cortes y se fotografiaron con microscopía de campo claro.

### Microscopia Electrónica de Barrido

Se utilizó para observar la micromorfología de las anteras y del polen, las cuales después de haberse fijado en FAA se deshidrataron en una serie gradual de alcoholes (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) por 1 h en cada uno, se desecaron a un punto crítico con CO<sup>2</sup>, se montaron en portamuestras y se cubrieron con oro para ser observadas al MEB.

### Microscopia de Fluorescencia

Para determinar el tipo de tétradas de las células madres de las microsporas se separaron flores de entre 2 y 4 mm las cuales se enjuagaron en agua para quitar el FAA, después se colocaron en hidróxido de sodio (NaOH) por 24 h, se enjuagaron con agua y se dejaron en azul de anilina por 48 h., posteriormente se montaron en un cubre objetos y se les hizo un squash, por último se observaron en microscopio de fluorescencia y se fotografiaron.

## RESULTADOS

### MORFOLOGÍA DE LA FLOR MASCULINA

*Halodule wrightii* es una especie dioica, cuya flor masculina es sumamente sencilla, pues carece de corola y cáliz y sólo está conformada por el androceo, que presenta 2 anteras tetrasporangiadas fusionadas en la parte dorsal desfasadas verticalmente una de otra (Fig. 14 E). Cada antera presenta 2 tecas con 2 microsporangios cada una. La flor se encuentra asociada a una bráctea, que es una hoja sin modificaciones, posicionada en la base del filamento (Figs. 14 C y D). En la parte apical del tallo donde se desarrolla la flor, se presenta otra estructura con 1 o 2 hojas planas las cuales están envueltas por otra hoja (prófilo), esta disposición peculiar se muestra y esquematiza en la figura 13.

Las flores masculinas jóvenes presentan un filamento sumamente corto, por lo que las anteras se sitúan a la altura del ápice del tallo vegetativo, la bráctea y las hojas envolventes del tallo cubren completamente las anteras (Figs. 14 A y B). Las anteras en desarrollo también permanecen protegidas con su bráctea (Figs. 14 C y D) y envueltas por las hojas exteriores. Las flores maduras presentan un filamento alargado, por lo que las anteras se elevan más allá del ápice del tallo, la bráctea y las hojas envolventes (Figs. 14 E y F).



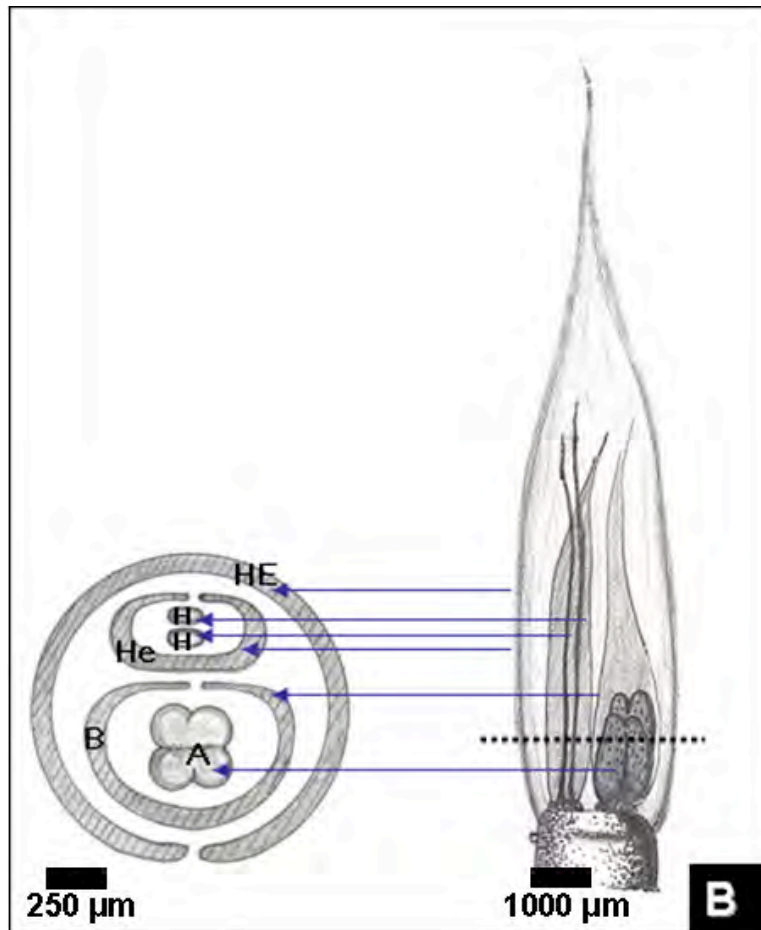
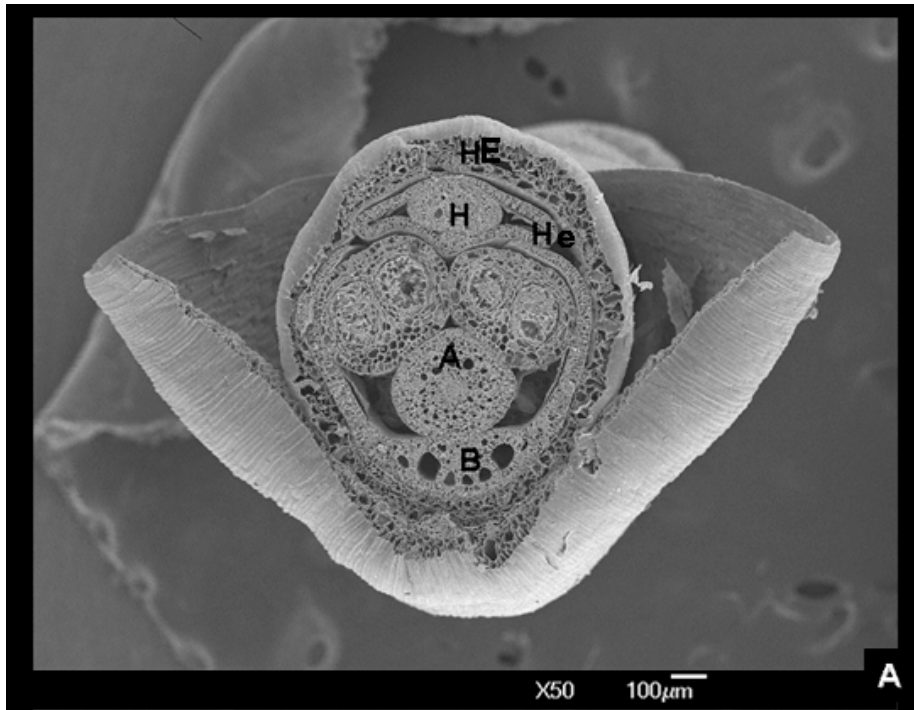


Figura 13. A) Micromorfología del botón de la flor masculina, corte transversal mostrando la distribución de las anteras dentro del botón floral; B) Esquema de la conformación de la unidad floral, en corte transversal (izquierda) y en sección longitudinal (derecha), la línea punteada indica la altura del corte y las flechas la relación de las estructuras de ambos esquemas. A- antera, B- bráctea, H- hoja, He- hoja envolvente, HE- hoja envolvente del tallo



Figura 14 A) Antera con hoja envolvente; B, C, D, E y F Flores masculinas en distintas etapas de desarrollo a las cuales se le ha retirado las hojas asociadas a la antera y en B, E y F adicionalmente se ha retirado la bráctea asociada; B) Flor masculina joven; C) Antera inmadura con su bráctea; D) Detalle de la bráctea asociada a la antera; E) Flor masculina madura; F) Detalle de la antera madura. A- antera, B- bráctea, H- hoja, F- filamento, Ta- tallo

## ANATOMÍA DE LA ANTERA

### Desarrollo de la antera

Después de realizar los cortes de cada una de las etapas, se observó que la longitud de las anteras era independiente del desarrollo del polen, ya que varias flores mostraban una etapa menor de desarrollo que su antera previa en tamaño, por lo que se utilizó el crecimiento del polen y de la pared de la antera para determinar su etapa de desarrollo.

En las anteras más jóvenes se observa una masa de células esporógenas agrupadas al centro del microsporangio (Figs.15 A-C). Muchas de éstas células esporógenas se encuentran aun en mitosis y presentan formas generalmente isodiamétricas con núcleos prominentes, en los que se pueden distinguir la cromatina y los nucléolos; además presentan citoplasmas densos. La pared de la antera se compone por epidermis monoestratificada sin acumulación de taninos y con una cutícula densa. La capa adyacente a la epidermis es el endotecio, que presenta 2 a 3 capas medias y contiguo a él se encuentra el tapete, que es biestratificado. El septo separa a los microsporangios y existe un tejido conectivo en el centro de la antera. En esta misma etapa se observan algunas divisiones periclinales, de las células de la capa parietal secundaria externa, que formarán el endotecio y una capa media. Divisiones periclinales de las células de la capa parietal secundaria interna formarán otro estrato celular de la capa media y el tapete. También se observan algunas divisiones anticlinales que incrementan el número de células de los diferentes estratos para el crecimiento de la antera (Figs.16 A y B).

En la siguiente etapa de desarrollo de las anteras ya se observan claramente diferenciadas las células tapetales y las células esporógenas. Ambos tipos celulares

acumulan rápidamente una gran cantidad de sustancias en su citoplasma (Fig. 16 C).

En la pared de la antera se puede observar la cutícula sobre las células de la epidermis, las cuales comienzan acumular sustancias. En la epidermis se distingue una zona que formará el estomio. Las células del endotecio presentan núcleos grandes, al igual que las capas medias que en esta etapa comienzan a adelgazarse. Por último las células del tapete aparentemente se acomodan en dos capas como se muestra en las figura 16 D.

Muy temprano en el desarrollo las células tapetales se rompen y su contenido ocupa el lóculo de la antera, por lo que este tipo de tapete es considerado de tipo plasmodial o amiboideo. Una vez que el contenido de las células tapetales llega al lóculo de la antera, se pueden observar núcleos con nucleolos y un citoplasma común (plasmodio) que se distribuye por todo el lóculo, que presenta proteínas y polisacáridos insolubles, los cuales se detectan en tinciones con azul negro de naftol y reactivos de shiff, respectivamente (Figs. 16 F, 17 A y B). Poco antes de la meiosis las células madres de la microsporas se separan unas de otras y forman células elípticas (Figs. 16 E y F), las cuales al igual que el tapete, tiene reacción positiva para azul negro de naftol, mostrando proteínas teñidas de color azul (Fig. 17 A) y para reactivo de shiff, mostrando polisacáridos insolubles teñidos de color rosa fuerte (Fig. 17 B).

### Microsporogénesis

Las células madres de las microsporas entran en meiosis y presentan citocinesis sucesiva que divide a las células madres de las microsporas generando 2 células sin que haya formación de pared. Estas células vuelven a dividirse para producir una tétrada isobilateral (17 C y D). Esta tétrada puede observarse claramente cuando es teñida con azul de anilina con microscopia de fluorescencia y en contraste de fases, denotando

también, la escasa depositación de calosa en las paredes de las esporas recién formadas (Figs. 17 E y F).

### Microgametogénesis

La microgametogénesis comienza cuando las esporas liberadas de la tétrada se alargan rápidamente generando células elipsoidales, que presentan núcleos enormes con gran cantidad de reservas en su citoplasma (Fig. 18 B). La pared de la antera, en la cual los microsporangios contienen en su mayoría células en la etapa de microgametogénesis, presentan una epidermis con acumulación de taninos, capas medias que comienzan a degenerar. También presenta un estomio adelgazado con una estructura bicelular, con células de paredes primarias que presentan una organización diferente al resto de la pared de la antera la cual persiste hasta el momento de la dehiscencia (Fig. 18 D).

Las microsporas entran en mitosis produciendo el núcleo vegetativo y el núcleo generatriz, entre los cuales se comienzan a formar 1 y posteriormente 2 vacuolas, que promueven el acomodo de los núcleos en las microsporas situando al núcleo vegetativo al centro y haciendo que el núcleo generatriz migre a la posición periférica de la célula (Figs. 18 B y C). El polen en esta etapa presenta paredes engrosadas, debido también al depósito de las sustancias del periplasmodio. Así mismo en el polen se observa la formación de una pared que divide la célula generatriz de la célula vegetativa, esta última presenta un núcleo más grande que el de la célula generatriz. Todavía posicionada la célula generatriz en la periferia de la célula vegetativa, se presenta la segunda mitosis de la célula generatriz con la que se generan 2 núcleos espermáticos (Figs. 18 E y F). El periplasmodio que rodea estas células es muy denso. En esta etapa y en la anterior de formación del polen, la pared de la antera presenta en esencia las mismas características.

En un mismo microsporangio se presentan distintas etapas de desarrollo de las esporas, desde la etapa de células madre de las microsporas, microsporas y polen joven (Fig. 18 A).

Los granos de polen formados siguen creciendo y alargándose. Sus núcleos se observan grandes y su citoplasma presenta una buena cantidad de reservas, el periplasmodio que rodeaba al polen comienza a desaparecer del lóculo. Las anteras en esta etapa presentan una epidermis con una mayor acumulación de taninos, así como degradación de las capas medias (Fig. 19 A).

El polen continúa su proceso de maduración alargándose aún más y dentro de él se observan los núcleos con el nucléolo, y su citoplasma comienza a consumir sus reservas, por lo que su interior se observa menos denso. En esta etapa la epidermis presenta una gran acumulación de taninos, que en ciertas células ocupan casi todo su interior; la capa del endotecio se adelgaza, la degradación de las capas medias es muy notoria, el tapete plasmodial desaparece visiblemente del lóculo y el septo comienza a adelgazarse (Fig. 19 B).

La epidermis muestra una mayor cantidad de células llenas completamente de taninos, se observa una mayor degradación del endotecio, las capas medias desaparecen, el estomio comienza a contraerse y el septo que divide los microsporangios se rompe (Fig. 19 C). El polen se alarga hasta adquirir la apariencia filiforme y en su interior se forman vacuolas con granos de almidón.

En la última etapa de desarrollo, antes de la dehiscencia, en la pared de la antera solo se observan reminiscencias del endotecio en algunas zonas de los microsporangios, el septo se contrae casi hasta su base y el estomio se abre por la línea de dehiscencia (Fig. 19 D).

El polen de esta etapa alcanza su forma final, presenta tres células y contiene una gran cantidad de vacuolas con almidón en su interior, las cuales se observan bien en microscopia de contraste de fases y presentan reacción positiva para lugol (Figs. 20 A-D).

### Vascularización de la antera

En la parte apical de la flor las dos anteras muestran un haz vascular cada una, que presenta un estele sin médula. El xilema es central con miembros de vasos poco lignificados, las células parenquimáticas del xilema presentan núcleos densos y acumulación de sustancias en su citoplasma. Las traqueidas y fibras xilares presentan muy poca depositación de lignina y celulosa, pues son imperceptibles en fluorescencia con tinciones de azul de anilina. Con respecto al xilema, el floema es concéntrico perifloemático, los elementos cribosos presentan células anucleadas con paredes delgadas, sin depositación aparente de calosa. Conforme los haces vasculares bifurcados se acercan hacia la parte media de la flor comienzan a juntarse hasta formar uno solo, mostrando en los cortes basales de la antera un solo haz vascular ya fusionado (Fig. 21). Los cortes seriados de flor en etapa madura y flor en etapa joven muestran el mismo patrón de fusión de haces vasculares.

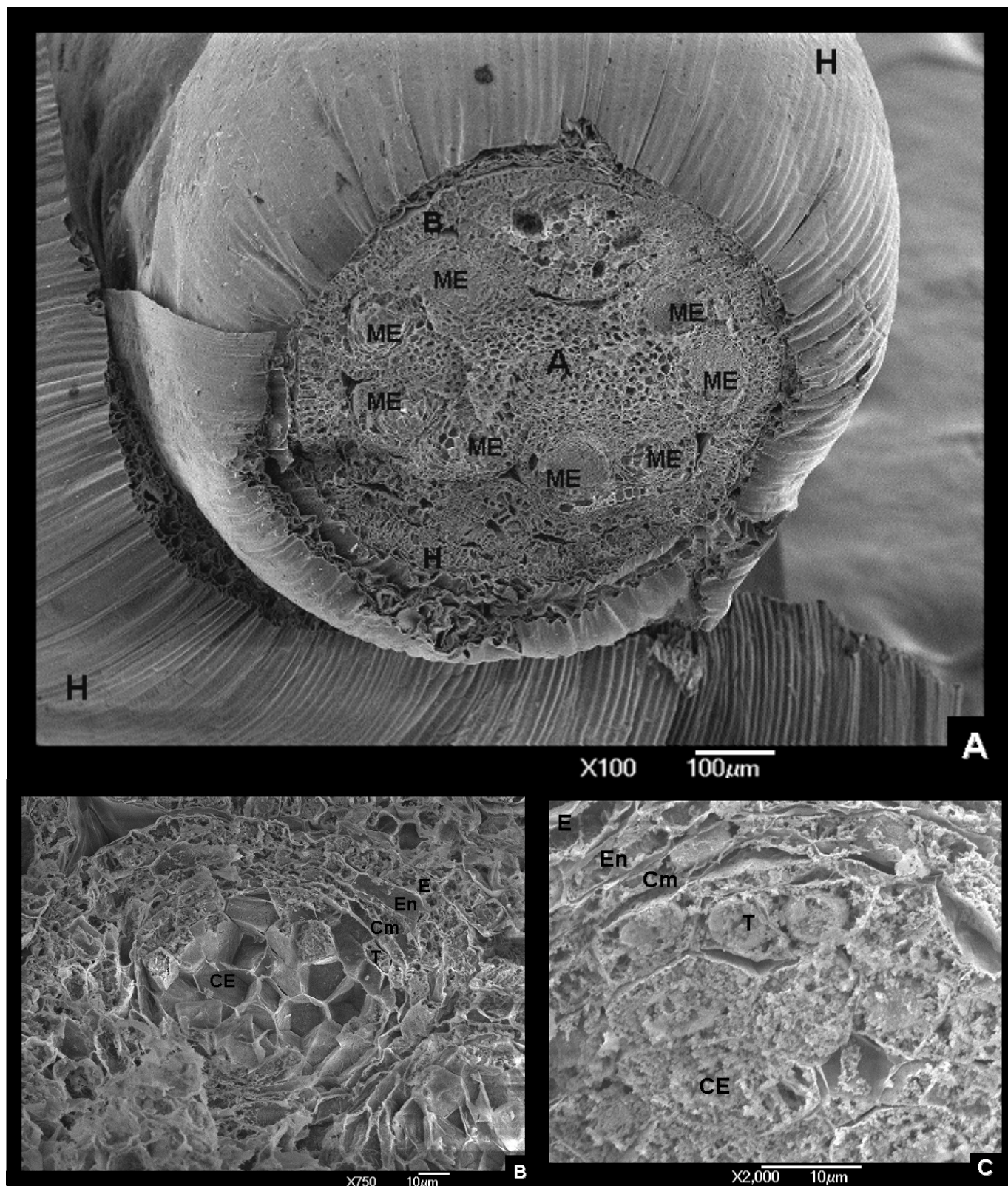


Figura 15. A) Micromorfología en corte transversal de una antera muy joven; B) Detalle de microsporángio; C) Detalle del contenido celular de la epidermis, el endotecio, las capas medias y las células esporógenas. A- antera, B- brácteas, CE- células esporógenas, Cm- capas medias, E- epidermis, En- endotecio, H- hoja, ME- microsporángio, T-Tatapete



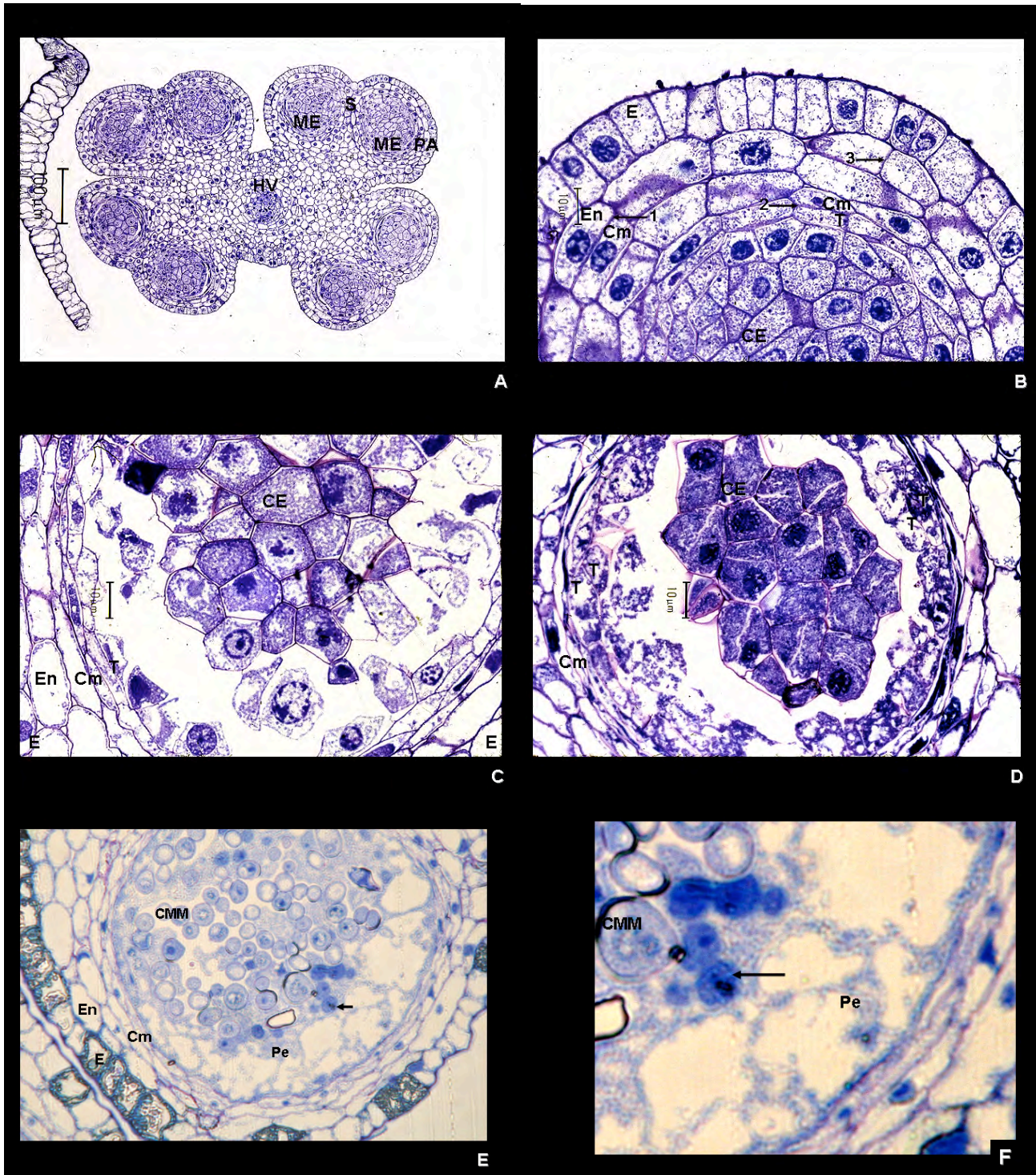


Figura 16. A) Corte transversal de antera joven; B) Detalle del acomodo de las células esporógenas y la pared de la antera donde se observan una división periclinal que origina el endotecio y una capa media (flecha 1) y otra división periclinal que origina una capa media y el tapete (flecha 2), así mismo se observa una división anticlinal en el endotecio (flecha 3); C) Microesporangio de antera joven con células esporógenas; D) Células esporógenas isodiamétricas en mitosis pre-meiotica rodeadas por el tapete periplasmal biestratificado en varias zonas y roto en algunas partes; E) Tapete periplasmal con núcleos prominentes (flecha) embebido completamente en el lóculo y rodeando a las células madres de las microsporas ahora con formas circulares. La epidermis presenta una mayor acumulación de taninos y las capas medias un adelgazamiento notorio; F) Detalle del citoplasma y núcleos de las células tapetales. CMM- células madres de las microsporas, Cm- capas medias, E- epidermis, En- endotecio, HV- haz vascular, ME- microsporangio, T- Tapete, PA- pared de la antera. Pe- periplasmio, S- septo

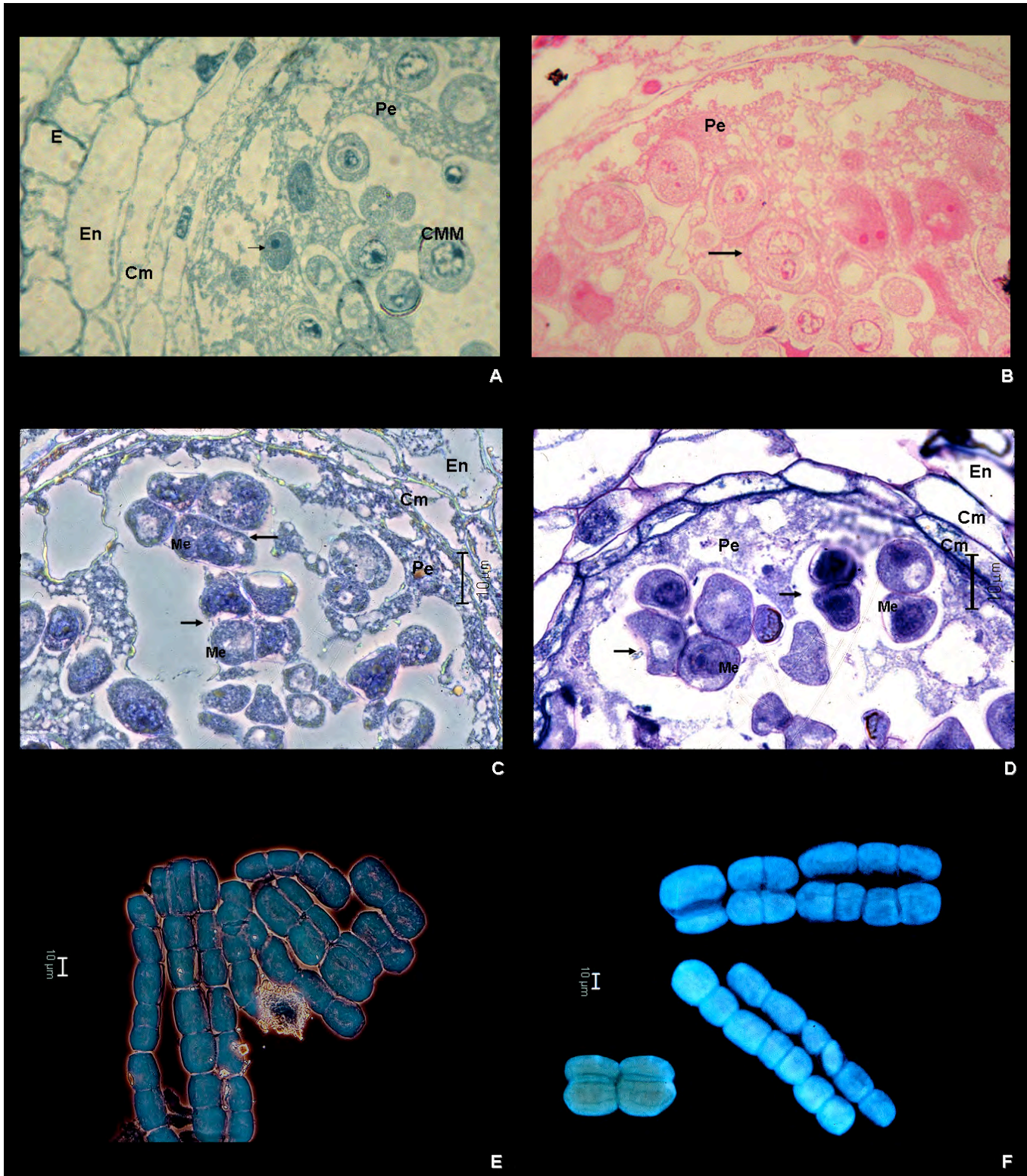


Figura 17. A) Células madres de las microsporas y células tapetales en degeneración con una gran cantidad de proteínas, teñido con azul negro de naftol, se observan algunos núcleos del tapete (flecha); B) Célula madre de la microspora en la primera división de la meiosis (flecha), se muestran una gran cantidad de polisacárido insolubles, teñidos con reactivo de shiff, en las células madres de las microsporas, en las microsporas y en el plasmodio; C) Tétradas isobilaterales (flechas) en contraste de fases; D) Microsporas separándose de la tétrada; E) Células madres de las microsporas con citocinesis de tipo sucesiva vista con fluorescencia y contraste de fases y teñidas con azul de anilina; F) Formación de las tétradas vista con fluorescencia y teñida con azul de anilina. CCM- células madres de las microsporas, Cm- capas medias, E- epidermis, En- endoteco, Me- microsporas, Pe- periplasmio

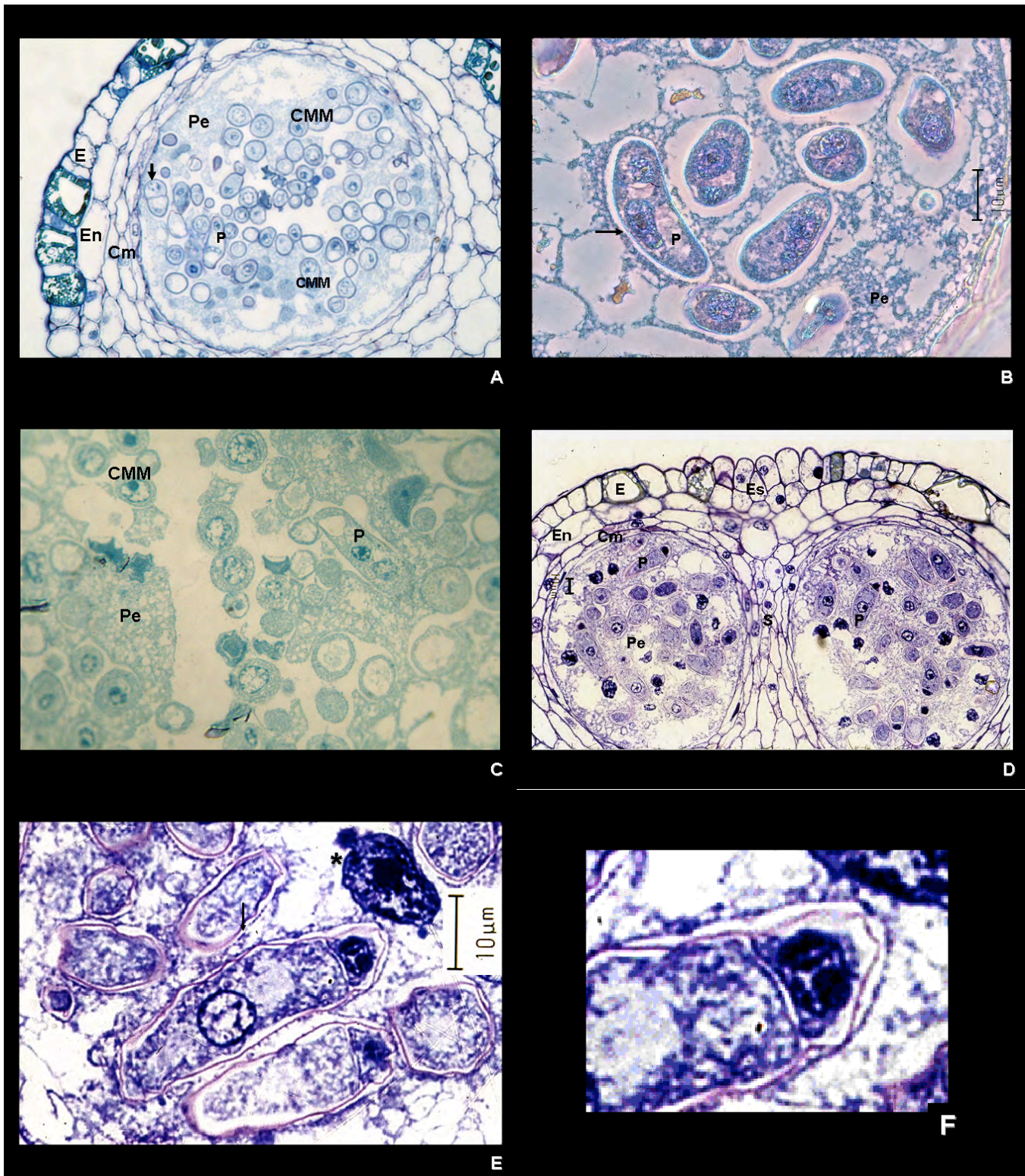


Figura 18. A) Diferentes estadios en la formación del polen en el mismo microsporangio se pueden observar células madres de las microsporas con formas circulares, primera división meiotica de una de estas células (flecha) y polen con vacuolas acomodando sus núcleos; B) Polen con núcleo y su nucléolo acomodados por la formación de vacuolas (flecha), visto en contraste de fases; C) Alargamiento del grano de polen, teñido con azul negro de naftol; D) Detalle del microsporangio en donde se observa la diferenciación de las células del estomio y las células de las epidermis, así mismo se muestra el endotecio y el septo integro y las capas medias degradándose; E) Posible microspora abortiva (asterisco) y grano de polen trinucleado, se observa una pared entre la célula generatriz y la célula vegetativa, además de la pared del grano de polen la cual presenta unión de fragmentos del periplasmodio (flecha). F) Detalle de los núcleos espermáticos. CCM- células madres de las microsporas, Cm- capas medias, E- epidermis, En- endotecio, P- polen Pe- periplasmodio

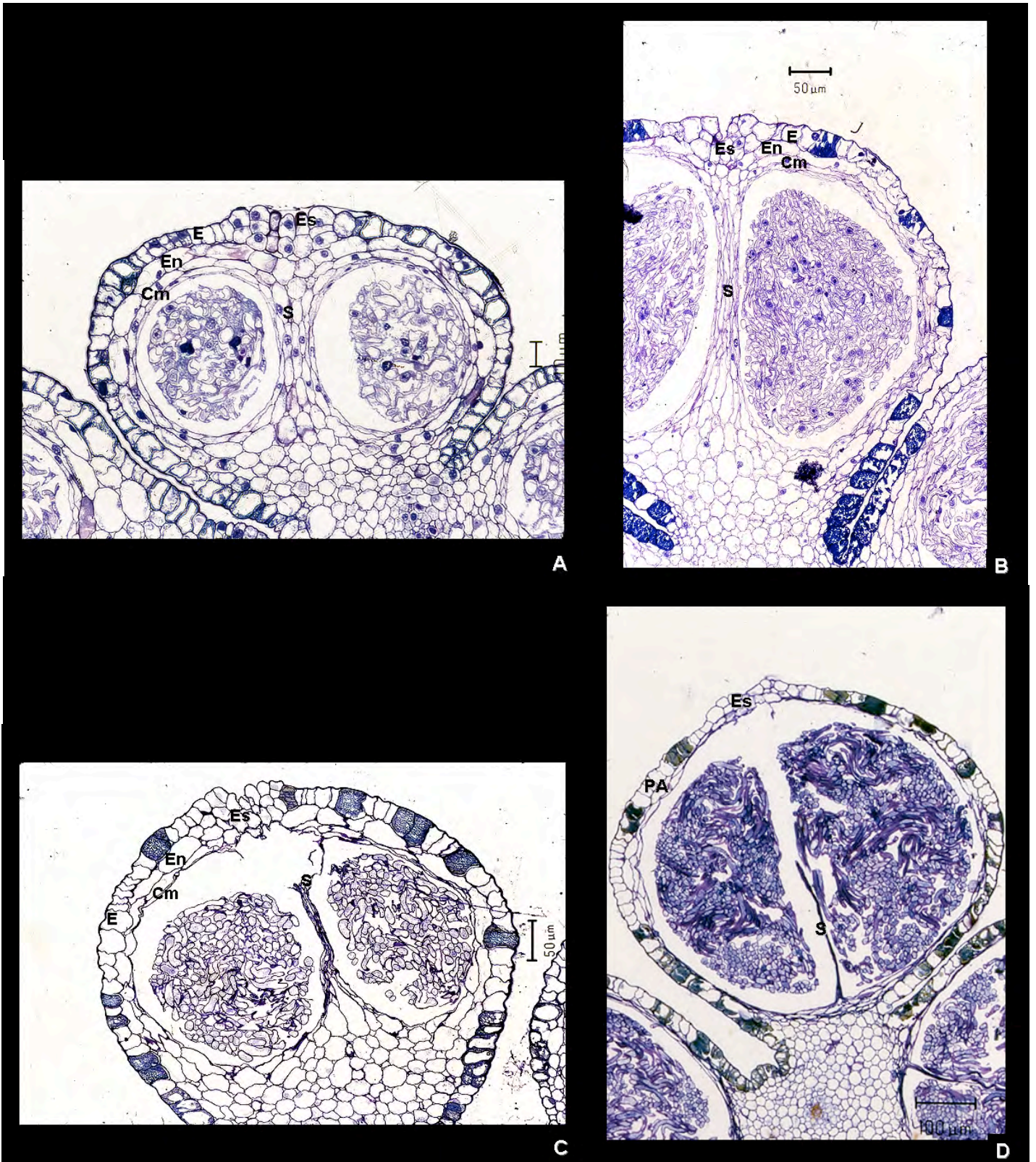


Figura 19. A) Microsporangios con polen en la etapa posterior a la microgametogénesis y septo íntegro; B) Microsporangios con polen en etapa de maduración, en esta etapa se comienza a abrir la línea de dehiscencia en el estomio y se adelgaza el septo; C) Microsporangios con polen en la penúltima etapa de maduración, en esta etapa se rompe el septo que separa los microsporangios; D) Microsporangio con polen maduro, el septo de los se ha contraído casi hasta su base. Cm- capas medias, E- epidermis, En- endotecio, Es- Estomio, PA- pared de la antera, S- septo

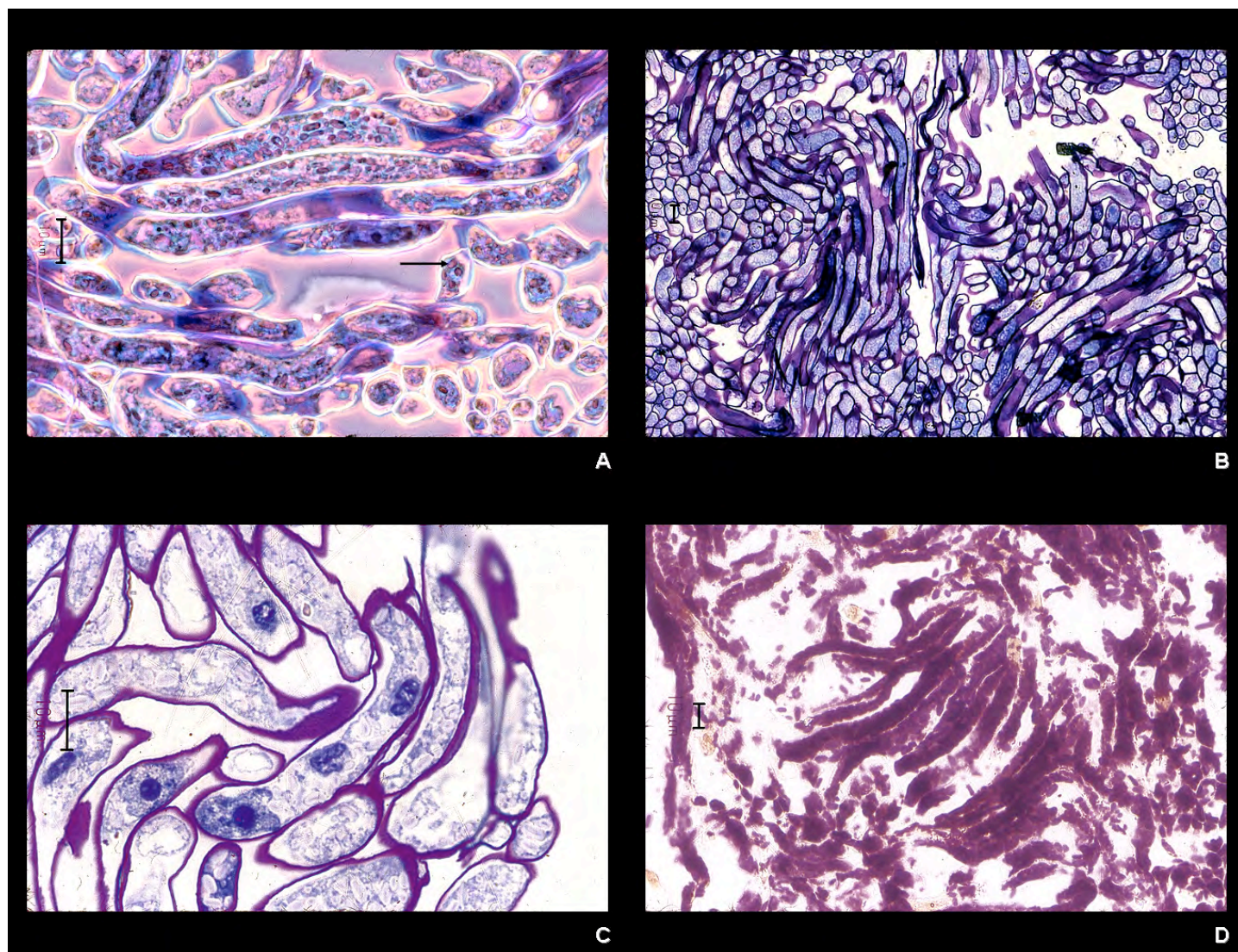


Figura 20. A) Polen filiforme maduro con una gran cantidad de vacuolas en su interior (flecha), visto en contraste de fases; B) Acomodo del polen maduro filiforme; C) Polen maduro trinucleado con vacuolas en su interior; D) Polen con una gran cantidad de almidón teñidos con lugol

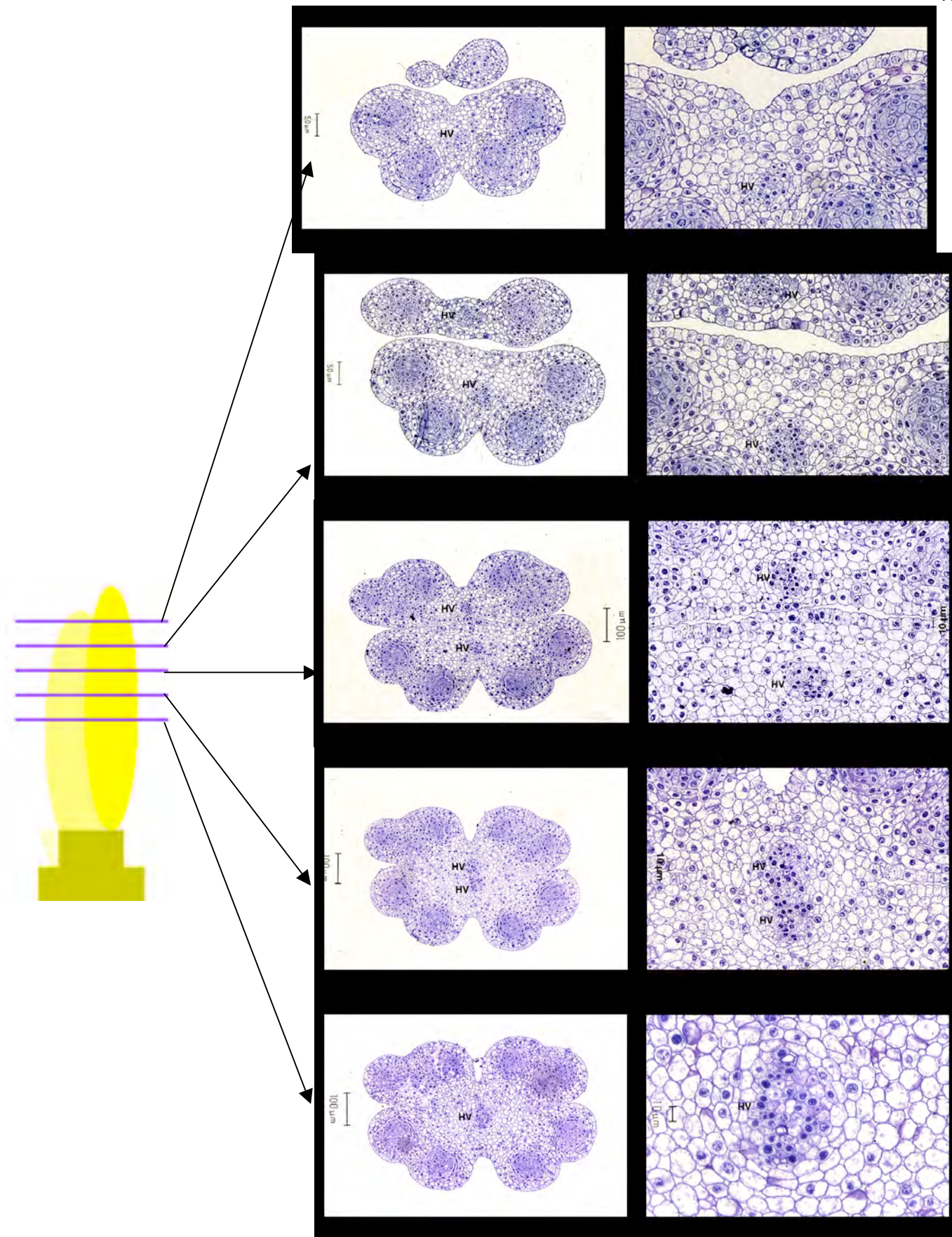


Figura 21. Cortes seriados de antera joven. HV- haz vascular

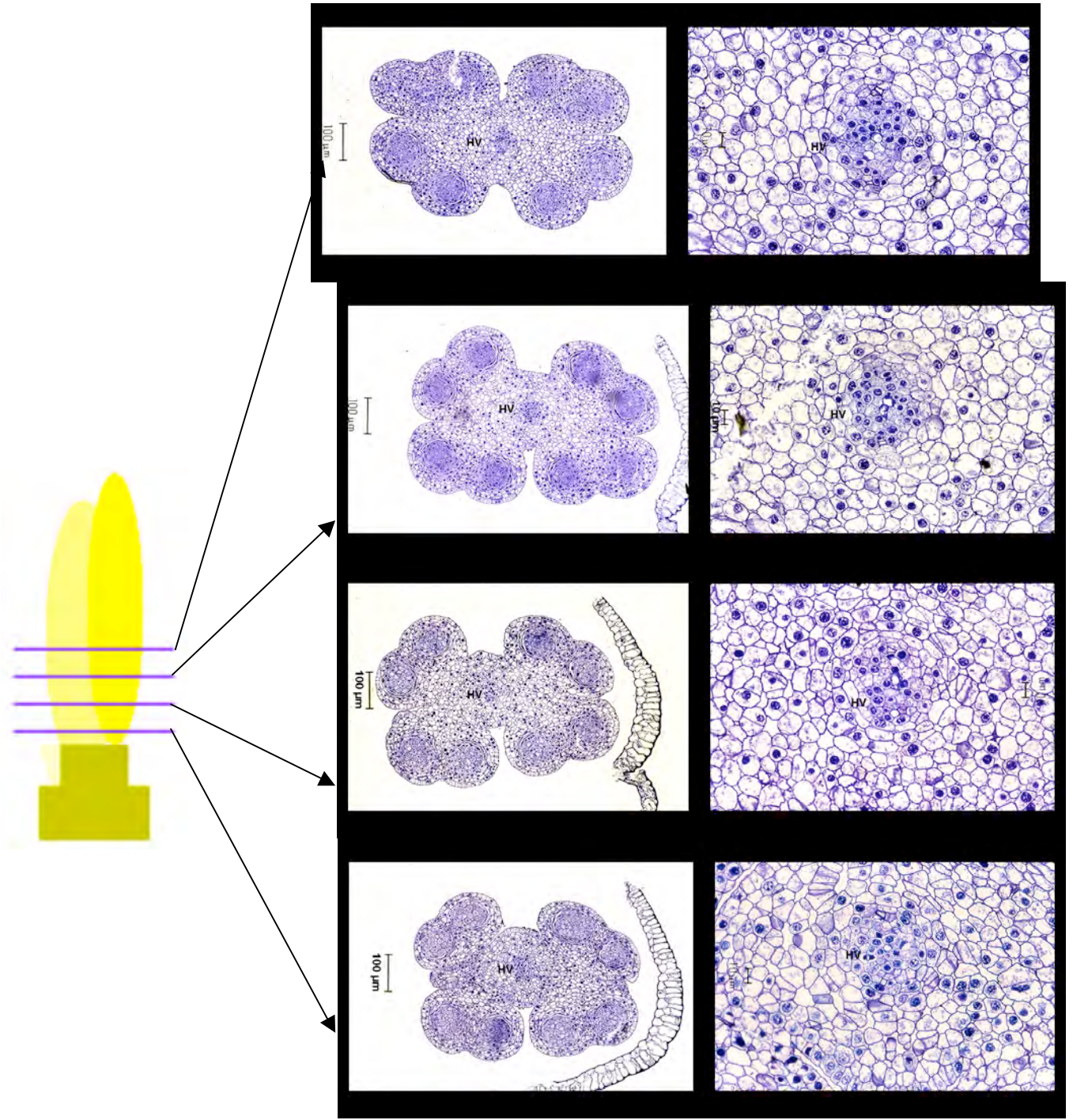


Figura 21 Continuación. Cortes seriados de antera joven. HV- haz vascular

## GRANOS DE POLEN

### Microestructura del polen

El polen es alargado y filiforme en etapas maduras (Fig. 22 A). La superficie del grano de polen se observa lisa en aumentos menores de 5000x (Fig. 22 C). Sin embargo esta visión se modifica cuando el aumento es mayor a 6000x, ya que la imagen cambia de un panorama sin ornamentación a una ornamentación verrugosa (Figs. 22 D-F). Los granos de polen se encuentran embebidos en una matriz que baña casi por completo la superficie de las masas que forman los granos de polen entrelazados. Esta acumulación de matriz proviene de los restos del plasmodio y es visible al MEB (Fig. 22 D). El tratamiento utilizado con detergente/agua de mar (9:1) con los granos frescos, logró quitar la mayor cantidad de los restos del plasmodio acumulado en la superficie del polen, sin dañar su estructura. Los tratamientos utilizados con enzimas destruyeron demasiado la superficie de la pared del polen como para poder determinar la ornamentación. Un cálculo del tamaño de un grano de polen filiforme dio una medida aproximada de 1000  $\mu\text{m}$ .

### Estructura del polen en el interior de la antera

Dentro de las anteras los granos de polen filiformes están enrollados varias veces sobre si mismos formando una estructura compacta que se forma en algunas plantas terrestres de la familia Orchidaceae (Figs. 23 A y B). Los granos de polen se liberan por las líneas longitudinales de dehiscencia formadas por células de paredes delgadas que permiten la apertura de la antera (Figs. 23 C y D).



### Estructura interna del polen

Al MEB es posible observar que el contenido citoplasmático del polen es granular debido posiblemente a la gran acumulación de sustancias de reserva (principalmente almidón) (Figs. 22 B y F), así mismo se observa una pared muy delgada sin estructura y ondulada en su parte externa.

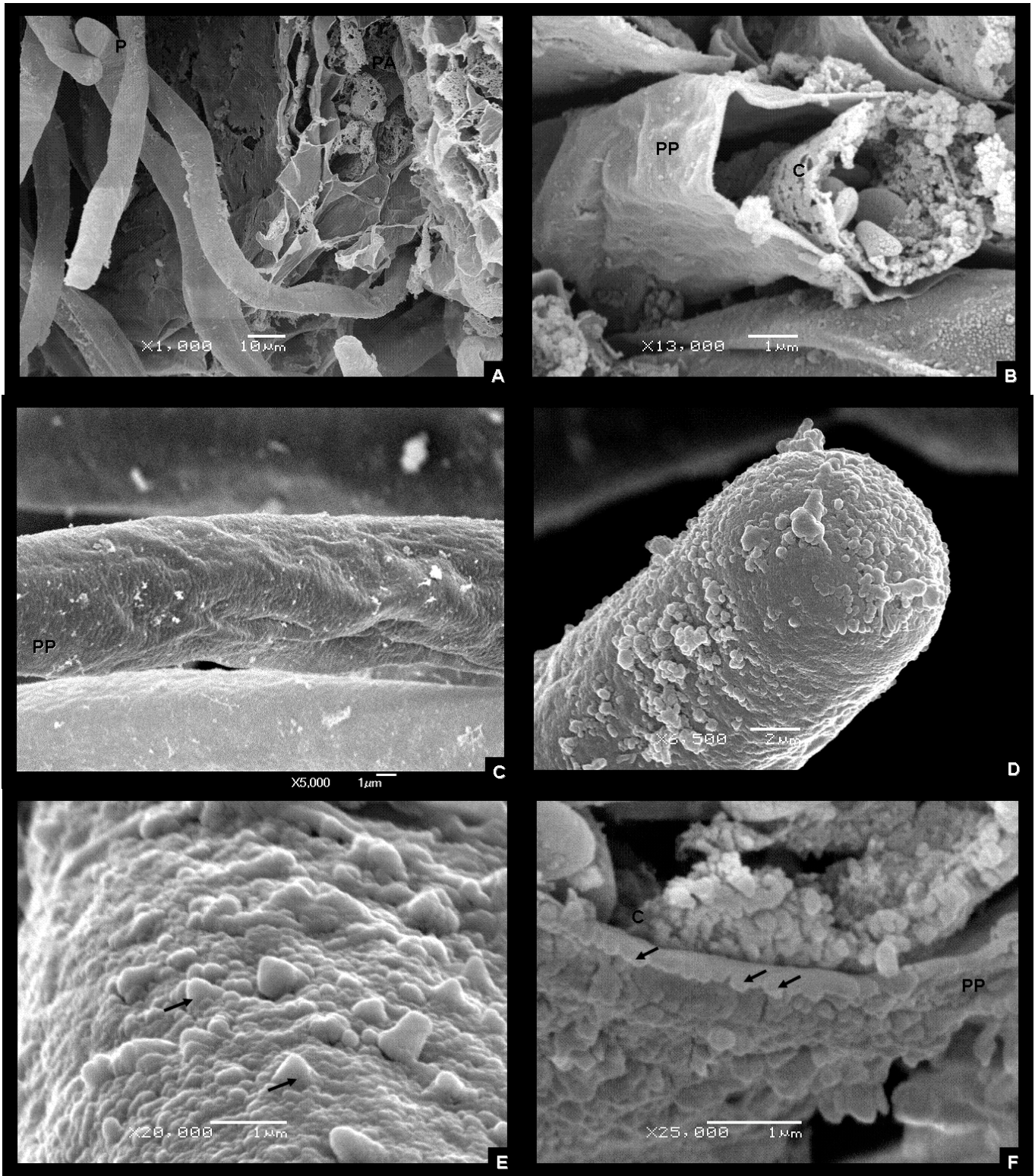


Figura 22. A) Polen dentro del microsporangio; B) Detalle del interior del polen; C) Detalle de la pared del polen con textura lisa; D) Detalle de la pared del polen con textura verrugosa; E) Detalle de la ornamentación del polen y verrugas de la exina (flechas); F) Sección del polen donde se muestra parte del citoplasma y la pared del polen con las verrugas de la exina (flechas). C- citoplasma, P- polen, PP- pared del polen

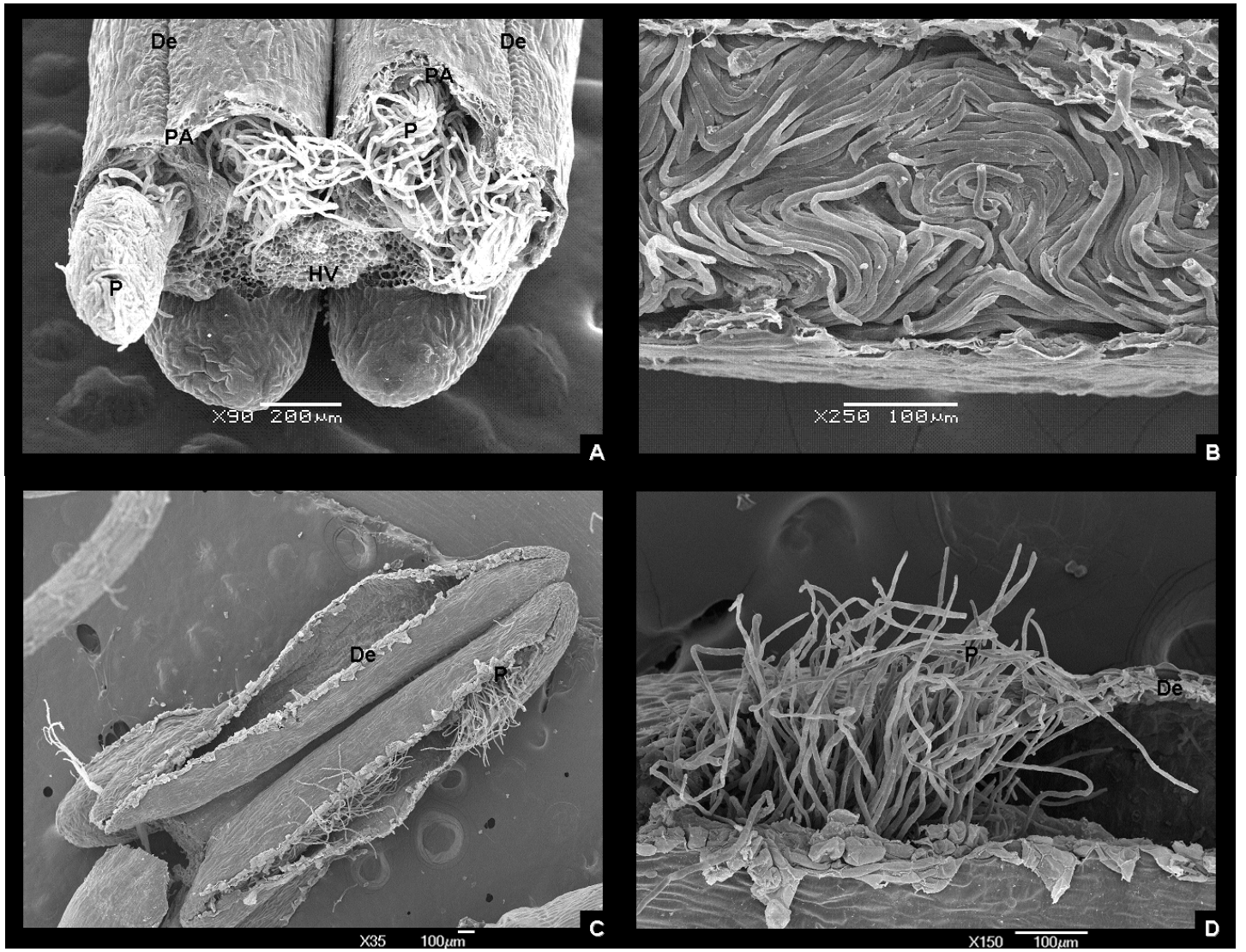


Figura 23. A) Antera y granos de polen; B) Detalle del acomodo del polen dentro de la antera; E) Antera dehiscente; D) Detalle de la dehiscencia y granos de polen. HV- haz vascular, De- línea de dehiscencia, PA- pared de la antera, P- polen

## DISCUSIÓN

Desde su colonización al medio marino, los pastos marinos han desarrollando cambios morfológicos y funcionales para poder adaptarse a los factores abióticos y bióticos de su entorno, muchos ajenos a lo conocido en plantas terrestres. Muestra de estas adaptaciones es la hidrofília, la cual es un mecanismo de polinización abiótica en el que el paso del polen, desde las anteras hasta los estigmas, se realiza completamente bajo el agua, utilizando como medio de transporte las corrientes marinas. La hidrofília en los pastos marinos, se caracteriza, entre otras cosas, por la dominancia de separación de los órganos masculino-femenino, que permiten altas tasas de entrecruzamiento, y por la reducción en la estructura floral (Van Tussenbroek *et al.*, 2009).

Según Ackerman (2006) la separación de las estructuras reproductoras en los pastos marinos puede ser de dos tipos: 1. en el espacio, en el caso de los nueve géneros dioicos, incluyendo todas las especies de la familia Cymodoceaceae, adicionalmente estas plantas pueden presentar síndromes de polinización con diclina (protoginia); 2. en el tiempo, vía polinización dicogamia (es decir separación fenológica entre la liberación del polen y la receptibilidad del estigma, usualmente protoginia), en el caso de los cuatro géneros monoicos. Sin embargo, no todos los pastos marinos presentan separación de las estructuras reproductoras. Aunque hay reportes de geitonogamia en las flores de *Zostera marina* (Reusch, 2001) y autofecundación en *Posidonia oceanica* (Balestri y Bertini, 2003).

En las angiospermas menos del 10% de los géneros son dioicos (Kuo y Den Hartog, 2006). En contraste nueve de los géneros en los pastos marinos (*Amphibolis*, *Cymodocea*, *Halodule*, *Syringodium*, *Thalassondendron*, *Phyllospadix*, *Enhalus*, *Thalassia* y *Halophila* que también presenta algunas especies monoicas, como *H. decipiens*, *H. capricornio* y *H. beccarii*) son dioicos, con la mayoría de flores masculinas y femeninas

solitarias; los cuatro géneros restantes son monoicos (*Posidonia*, *Ruppia*, *Heterozostera* y *Zostera*). Dentro de este grupo *Ruppia* y *Posidonia* presentan flores perfectas en inflorescencias y *Heterozostera* y *Zostera* presentan flores unisexuales en una inflorescencia espata-espádice. En la familia Cymodoceaceae los géneros *Cymodocea* y *Halodule* presentan flores solitarias terminales en los haces (Den Hartog y Kuo, 2006). Las flores de *Syringodium* spp. se acomodan en una inflorescencia cimosa (Tomlinson y Posluszny, 1978). *Amphibolis* y *Thalassodredon* tienen flores solitarias al final de sus ramificaciones (Ducker et al., 1978). En los pastos marinos las flores estaminadas y carpeladas parecen estar organizadas en un número de patrones diferentes que no manifiestan un patrón sistemático, es decir Hydrocharitaceae, que conserva muchas de sus características de sus parientes de aguas dulce en contraste con otras familias de pastos marinos, como las Cymodoceaceae que presentan varias adaptaciones a la vida marina, incluyendo una gran reducción en sus estructuras florales.

Las flores masculinas de *Halodule wrightii*, y en general de la familia Cymodoceaceae, son de tamaño pequeño y no presentan colores vistosos, adicionalmente la reducción floral está marcada por la ausencia de la corola y cáliz, aunque el arreglo floral de cada uno de los géneros es distinto. El androceo de las flores masculinas de esta familia consiste de dos anteras fusionadas dorsalmente a la misma altura, excepto en *Halodule* donde una de las anteras se encuentra más arriba que la otra, una a cuatro brácteas pueden envolver las flores (Den Hartog y Kuo, 2006).

El arreglo de la posición terminal en donde se presenta la unidad floral, que se describe aquí para *H. wrightii*, es similar al representado por Tomlinson (1982) para el género *Halodule*, con la diferencia de que la hoja foliar (que en este trabajo se define como bráctea) cubre a las anteras, al prófalo y a las hojas que este envuelve (Fig. 24 B). La unidad floral de *Syringodium filiforme* también tiene un arreglo similar al de de *H. wrightii*,

las anteras y una hoja con el prófalo están cubiertas por una bráctea (la cual es modificada en *Syringodium* y foliar en *Halodule*), frente a ellas se encuentra una rama de la inflorescencia envuelta por un prófalo y a su vez todo esta rodeado por otra bráctea, que sustenta el tallo de la inflorescencia (Fig. 24 C; Tomlinson y Posluszny, 1978). La flor de *H. wrightii* es solitaria, y solo hay una bráctea que la sustenta, por lo tanto es más sencilla que el arreglo de la inflorescencia racimosa/cimosa de *Syringodium filiforme*, que según su posición en la inflorescencia puede presentar 2 a 4 brácteas.

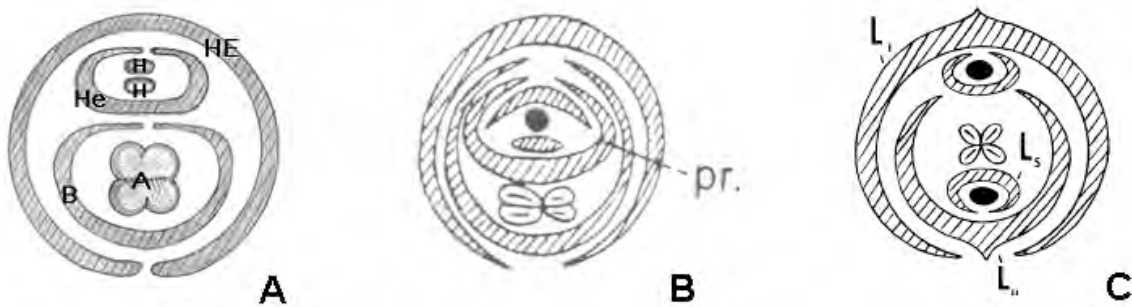


Figura 24. Esquemas de la unidad floral. A) *Halodule wrightii* (ver página 35 de resultados); B) *Halodule* (Tomado de Tomlinson, 1982); C) *Syringodium filiforme* (Tomado de Tomlinson y Posluszny, 1978). A- antera, B- bráctea, H- hoja, He- hoja envolvente, HE- hoja envolvente del tallo, ME- microsporangio, pr- prófalo, Li y Lii- bráctea, Ls- prófalo

La fusión de las anteras se ha reportado para todos los miembros de la familia Cymodoceaceae (Den Hartog, 1970); sin embargo, no existe un estudio específico de cómo se fusionan los haces vasculares en las anteras. Varios autores han descrito la anatomía de las anteras en todos los miembros de la familia Cymodoceaceae (Tomlinson y Posluszny, 1978; Tomlinson, 1982; McCochine *et al.*, 1982). Kuo y McComb (1998) señala que la anatomía reproductiva de los miembros de la familia es muy similar, la vena principal, que viene desde el tallo, se divide en la base flor, una ramificación llega a la bráctea y la otra se divide nuevamente y suministra a la antera o el pistilo, en la antera cada haz puede o no conducir al apéndice terminal de la antera. Tomlinson y Posluszny (1978) señalan que en *Syringodium filiforme* el apéndice inicial de las anteras es bilobulado, sin embargo, marcan que esto es poca evidencia del par de anteras en la flor madura, en sus cortes de la antera solo observa un haz vascular, aunque no se especifica

a qué altura es el corte, por lo que sugieren que la vascularización no es suficiente para soportar la interpretación de la estructura dual de la antera, ya que en el tallo solo hay un haz vascular y los haces de la antera apenas forman dos cadenas discretas. En *Halodule wrightii* el ápice de la flor presenta dos anteras, no fusionadas, cada una con un haz vascular, entre la parte superior y la parte central se fusionan a la par los haces vasculares, por lo que en la parte basal de la flor solo se presenta un haz vascular central. Es posible que este patrón de fusión sea parecido en los diferentes géneros de la familia Cymodoceaceae, sin embargo, como los demás géneros presentan sus anteras a la misma altura, la fusión no es tan fácil de distinguir y por lo que posiblemente Tomlinson y Posluszny (1978) no la consideraron importante.

Los pastos marinos presentan adaptaciones a las condiciones de vida marina, que no presentan otras plantas, por lo que es difícil tratar de acoplar a veces la terminología de las plantas terrestres a los diferentes arreglos que observamos en los pastos marinos. Un ejemplo de esto es la discusión que se ha dado para determinar si las estructuras foliares que sostienen a las anteras se identifican como brácteas. Existen varias definiciones de bráctea. Según Schmidt y Joker (2001) la bráctea es una hoja modificada que se desarrolla en la base de la flor, la inflorescencia o el eje floral. Warren-Morris y Zetina-Morris (2002) y Baiely (2003) señalan además que esta puede ser muy reducida en relación con las hojas vegetativas de una misma planta. Tcherkez (2004), señala que la bráctea es un elemento de la arquitectura foliar que constituye una entidad perfectamente definida, aparentemente en algunos taxa presenta una forma derivada que puede ser altamente modificada o no, soportando la estructura floral entera. Según Bell y Bryan (2008) cualquier hoja, modificada o no, que sostiene a una flor puede ser denominada bráctea. En esta tesis se aplica esta última definición. Ronse De Craene (2010), señala que la transición entre hojas y flores es usualmente intermediada por brácteas (también llamadas ferófilas), sin embargo estas no son órganos florales, aunque pueden llegar a

estar muy cercanamente asociadas con las flores y secundariamente incluirse como parte del perianto (Ronse De Craene, 2007). La bráctea es una característica sobresaliente de muchas inflorescencias de monocotiledóneas. En monocotiledóneas existe, usualmente, una bráctea abaxial y una bractéola adaxial (Arber, 1925). Es muy difícil hacer una clara diferenciación entre brácteas y bractéolas, por lo que la argumentación de su distinción es muchas veces artificial. Esto mismo ocurre al diferenciar entre las hojas que rodean a las flores de *Halodule wrightii* y las brácteas, pues la estructura foliar que sustenta la flor presenta una morfología y anatomía similares a las otras hojas del tallo.

Las brácteas protegen las anteras de daño por factores ambientales tales como abrasión, o remoción por oleaje, aunque la protección contra herbívoros también juega un papel importante (Muhlia-Montero, 2011).

La gran acumulación de taninos observada en las células de la epidermis de las anteras de *H. wrightii*, y en general de los pastos marinos que se han estudiado, es importante en la protección de los órganos reproductores, ya que evitan la herbívora (Becker, 1984; Bennett y Wallsgrave, 1994; Esau, 1977; Fenical, 1988; Fhan, 1990; Reed, 1995). Este tipo de sustancias también se han detectado en las flores femeninas y en frutos como el de *Thalassia* (Jiménez, 2004), *Syringodium* (Guzmán, 2009), *Halophila*, *Halodule* (Bragg y McMillan, 1996; Kuo y Kirkman, 1992) y *Cymodocea* (Caye y Meinesz, 1986). Sin embargo, esta característica no es exclusiva de los pastos marinos, los taninos son compuestos comunes en el reino vegetal, tanto gimnospermas como angiospermas los presentan, siendo más comunes en las dicotiledóneas que en las monocotiledóneas (Raven *et al.*, 2005).



Varias de las características morfológicas que presentan los pastos marinos, como la reducción en las estructuras florales y la separación de sexos, son poco útiles para generar una hipótesis sistemática, pues son derivadas de procesos convergentes de adaptación al ambiente marino. En las angiospermas como en los pastos marinos la reproducción sexual recae en las estructuras reproductoras que participan en la fecundación. Autores como Furness y Rudall (1997; 1999; 2000; 2001) han utilizado como indicadores para establecer relaciones entre los diferentes grupos de monocotiledóneas los procesos reproductivos de las especies, como la formación del polen, ya que son eventos más conservados que las características morfológicas.

Furness y Rudall (2001) señalan que las características del polen y la antera han sido frecuentemente consideradas significantes en la sistemática de monocotiledóneas, tanto por encima como por debajo del nivel de familia. Características tales como microsporogénesis (Rudall *et al.*, 1997; Furness y Rudall, 1999; Furness y Rudall, 2000a), tipo de tapete (Furness y Rudall, 1998) y polen aperturado o inaperturado (Furness y Rudall, 1999; Furness y Rudall, 2000b) han sido evaluados en el contexto de las nuevas filogenias y clasificación de monocotiledóneas. Estos caracteres en conjunto con los avances en sistemática molecular han mejorado nuestro entendimiento de las relaciones filogenéticas de muchos grupos de monocotiledóneas, por lo que este estudio es una aportación al respecto.

El desarrollo de la pared de la antera y las características de las capas que la integran nos pueden ayudar a entender mejor el desarrollo del polen y su liberación, pues desempeñan un papel importante en la formación del polen.

El endotecio es una capa de la pared de la antera muy importante en las plantas terrestres y generalmente presenta bandas fibrosas. La expansión diferencial de sus

paredes tangenciales externas e internas y la naturaleza celular higroscópica ayuda a la dehiscencia de las anteras maduras, por lo que generalmente persiste junto con la epidermis durante la existencia de la antera (Márquez-Guzmán, 2011). En plantas acuáticas con flores sumergidas, incluyendo a todos los miembros de la familia Cymodoceaceae y otros pastos marinos, el endotecio no forma bandas fibrosas ni engrosamiento en sus paredes, y de hecho en *Halodule wrightii* la mayor parte de la capa del endotecio se degrada en anteras maduras, por lo que los mecanismos para realizar la dehiscencia de la antera recaen en las células del estomio, que se diferencian de las células de la epidermis por presentar paredes delgadas. Posiblemente esta zona de ruptura de la antera esta sustentada por procesos adaptados a las condiciones del medio marino. Un posible mecanismo de dehiscencia es el siguiente: la solución dentro de las vainas de los pastos marinos es hipotónico en relación al agua salada del mar (Tyerman, 1989). Varias horas antes de la antesis la antera emerge de la vaina ocasionando que las células de la epidermis sufrán plasmolisis, debido a la pérdida de agua por estar en un medio de hiperosmótico. Las paredes delgadas de las células de la zona del estomio colapsan resultando en la apertura de la línea de dehiscencia de la antera. Esto es un posible escenario de dehiscencia, pero se requiere más estudios al respecto.

Mientras que la epidermis y el endotecio muestran uniformidad en las Cymodoceaceae, el número de estratos de las capas medias y del tapete varían entre los géneros. Las funciones de estos estratos, principalmente la del tapete, están muy relacionadas con el desarrollo del polen. Para *H. wrightii* la mayor actividad de las capas medias se presenta en anteras jóvenes mucho antes de que empiece la meiosis, por lo que sus funciones se limitan al almacenamiento y transporte de sustancias para el desarrollo de las células madre de las microsporas.

En las angiospermas se distinguen dos tipos de tapete: el de tipo plasmodial (también llamado amiboideo o invasivo) y el tipo secretor (también llamado granular o parietal). Tiwari y Gunning (1986) describen un tercer tipo de tapete, el invasivo no-sincial en *Canna* (Cannaceae). En solo once familias de dicotiledóneas y una familia de monocotiledóneas se ha reportado el desarrollo del tapete plasmodial y secretor, lo que sugiere que el tipo de tapete es una característica ancestral, muy uniforme entre los taxa de monocotiledóneas. El tapete secretor es el más común en las dicotiledóneas, ocurre en 154 familias, mientras que en las monocotiledóneas solo se presenta en 21 familias.

El tapete plasmodial se ha reportado en 14 familias de dicotiledóneas y en 18 de monocotiledóneas (Rudall y Furness, 1997). Muchos taxa en el clado de Alismatales ramificados tempranamente, y en donde se encuentran todos los pastos marinos, tienen predominantemente tapete plasmodial (en Araceae y los Alismatides), con excepción del género *Acorus*, el cual proviene de la línea más antigua de las monocotiledóneas en muchos análisis moleculares, y del género *Tofieldia* (Tofieldiaceae) que presentan un tapete de tipo secretor con (Furness y Rudall, 2001).

En clado Liliode solo la familia Hipoxidaceae, ramificada tempranamente, los géneros *Pandanus* (Cheah y Stone, 1975) y posiblemente *Freycinetia* (Pandanaceae) (Rudall y Furness, 1997) presentan tapete plasmodial. Los otros cuatro órdenes de liliode (Panales, Discorales, Liliales y Asparagales) presentan tapete secretor. Dentro del clado de commelinoide los Zingiberales y tres familias del orden Commelinales (Commelinaceae, Haemodoraceae y Pontederiaceae) presentan principalmente tapete plasmodial o invasivo no-sincial. En Poales, Sparganiaceae, Typhaceae y *Abolboda*, presentan tapete plasmodial; sin embargo, podrían ser más, ya que en varios taxones del orden no se ha estudiado esta característica (Fig. 25).

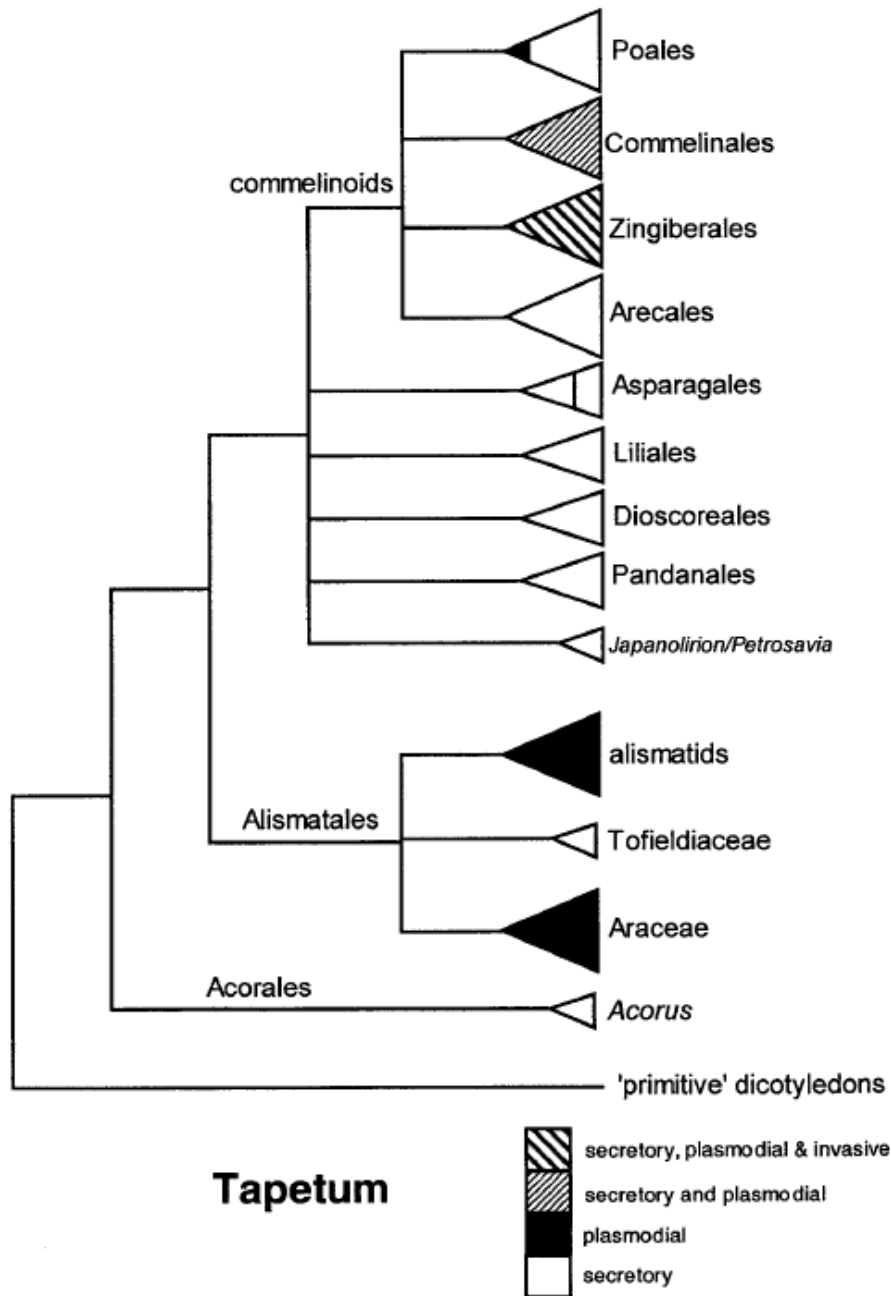


Figura 25. Relación entre los clados principales de monocotiledóneas y tipo de tapete que presentan, con la clasificación del Grupo de Filogenia de Angiospermas (1998) (Tomado de Furness y Rudall, 2001)

El tapete plasmodial se presenta en todas las especies de Alismatales y, por lo tanto, en los pastos marinos (ver tabla 4). Sin embargo el desarrollo, estructura y momento en que se rompe difiere entre las especies. En *Halodule wrightii* el tapete se separa de la pared de la antera cuando las células esporógenas aun están intercomunicadas en mitosis, y posteriormente las células del tapete se rompen precozmente antes de que las células madre de las microsporas entren en meiosis. Este mismo proceso fue observado en

*Halodule pinifolia*, *Halodule univervis* (Yamashita, 1976) y *Thalassodendron ciliatum* (Ducker *et al.*, 1978); en *Amphibolis antarctica* el tapete se rompe al final de la meiosis (Ducker *et al.*, 1978). El número de capas que presenta el tapete varía entre las especies de la familia Cymodoceaceae. Para *Syringodium filiforme* se observan de dos a tres capas (Ducker *et al.*, 1978), *Amphibolis antarctica* presenta cuatro capas (Ducker *et al.*, 1978), *Halodule wrightii* dos capas, y Yamashita (1976) señala una capa del tape para *H. pinifolia* y *H. univervis*.

En la mayoría de las plantas, los precursores de la esporopolenina son sintetizados por la misma microspora durante la etapa de tétradas y por el tapete predominantemente en la etapa post-meiotica. Otra de las funciones del tapete en la etapa post-meiotica, que ocurre en la mayoría de las angiospermas, es la formación de una cubierta del polen llamada cemento polínico o pollenkitt, que es una capa hidrofóbica compuesta principalmente de lípidos y carotenoides, que generalmente se depositan sobre la superficie de la exina. Esta capa ayuda a mantener los granos de polen juntos, ayuda a atraer a los insectos, protege al polen de la radiación ultravioleta y lo adhiere al cuerpo de los insectos, además esta involucrada en la compatibilidad esporofítica (Marquéz-Guzmán, 2011). Se ha observado que en los granos de polen transportados por el viento (anemófilos) el pollenkitt se produce en mucho menor cantidad y su consistencia es polvosa. Es posible que esto se relacione de alguna manera con la independencia de factores bióticos para trasladar el polen. En los pastos marinos, con polinización hidrófila, no se ha detectado esta capa, y posiblemente también este relacionado con la ausencia de polinizadores bióticos. Aunque también la presencia de sustancias hidrofóbicas (lípidos hidrófobos) podrían ser utilizados en las células tapetales para cubrir la superficie de los granos de polen (Pettit, 1980), posiblemente sustituyendo al pollenkitt. La presencia de estos lípidos hidrófobos formaría una cubierta repelente al agua que protegería los granos de polen de la deshidratación en su trayecto hacia el estigma de una flor.

El polen filiforme es claramente una adaptación al medio marino, se produce en nueve géneros (*Amphibolis*, *Cymodocea*, *Halodule*, *Syringodium*, *Thalassodendron*, *Posidonia*, *Heterozostera*, *Phyllospadix* y *Zostera*) de los 13 de pastos marinos (Ackerman, 2006). Los rasgos particulares del desarrollo varían entre las familias y los géneros. Esta discusión se enfocará principalmente en las comparaciones del desarrollo del polen filiforme (ver tabla 4).

En todas las especies de la familia Cymodoceaceae, las células madre de las microsporas son elípticas al momento de la meiosis (Yamashita, 1976; Pettitt, 1981; Pettitt *et al.*, 1981; Pettitt, 1984). Para las otras familias con polen filiforme esta característica cambia, por ejemplo, las células madres de las microsporas de la familia Zosteraceae son filiformes (Rosenberg, 1901; Pettitt y Jermy, 1975, Stewart y Rudenberg, 1980; en Ackerman, 2006). En la familia Posidoniaceae no se ha estudiado el desarrollo del polen.

La meiosis facilita la recombinación genética, la cuál constituye el evento más significativo de la reproducción sexual, ya que genera variabilidad genética que ayuda a las poblaciones a soportar las presiones de selección natural. Hay dos patrones básicos de citocinesis para la formación de la tétrada de microsporas: la microsporogénesis de tipo sucesiva (como ocurre principalmente en monocotiledóneas) y la de tipo simultánea (como ocurre principalmente en dicotiledóneas).

La meiosis sucesiva y las tétradas isobilaterales también parecen ser un rasgo característico de la familia Cymodoceaceae pues se han observado en *Thalassodendron ciliatum* (Ducker *et al.*, 1978), *Cymodocea nodosa* (Emberger, 1960; en Johri, 1984), *Amphibolis antarctica* (Ducker *et al.*, 1978), *Halodule pinifolia*, *H. univervis* (Yamashita, 1976) y *H. wrightii*. Los géneros de Zosteraceae, como en *Zostera marina* (Rosenberg,

1901 en Johri et al., 1982; Pettitt y Jermy, 1975; Pettitt, 1981) y *Phyllospadix torreyi* (Stewart y Rüdénberg, 1980), también la presentan y, aun que no se ha estudiado, es posiblemente los géneros de Posidoniaceae de igual manera generen meiosis sucesiva y tétradas isobilaterales (Ackerman, 2006).

El tipo de microsporogénesis parece tener un significado sistemático dentro de las monocotiledóneas, pues en la mayoría de ellas se presenta microsporogénesis de tipo sucesiva. El tipo simultáneo probablemente ha surgido por lo menos seis veces de forma independiente (Furness y Rudall, 2001). La mayoría de las taxa tempranamente ramificados como *Acorus* y las Alismatales, en donde se incluyen las Cymodoceaceae, presentan microsporogénesis de tipo sucesiva. Los 4 órdenes de Liliode (Pandanales, Dioscoreales, Liliales y Asparagales) presentan, en su mayoría microsporogénesis sucesiva, de igual modo en el clado de los Commelinoides predomina el tipo sucesivo, aunque ambos tipos se presentan en 2 grupos: Arecaceae y Poales (Fig. 26).

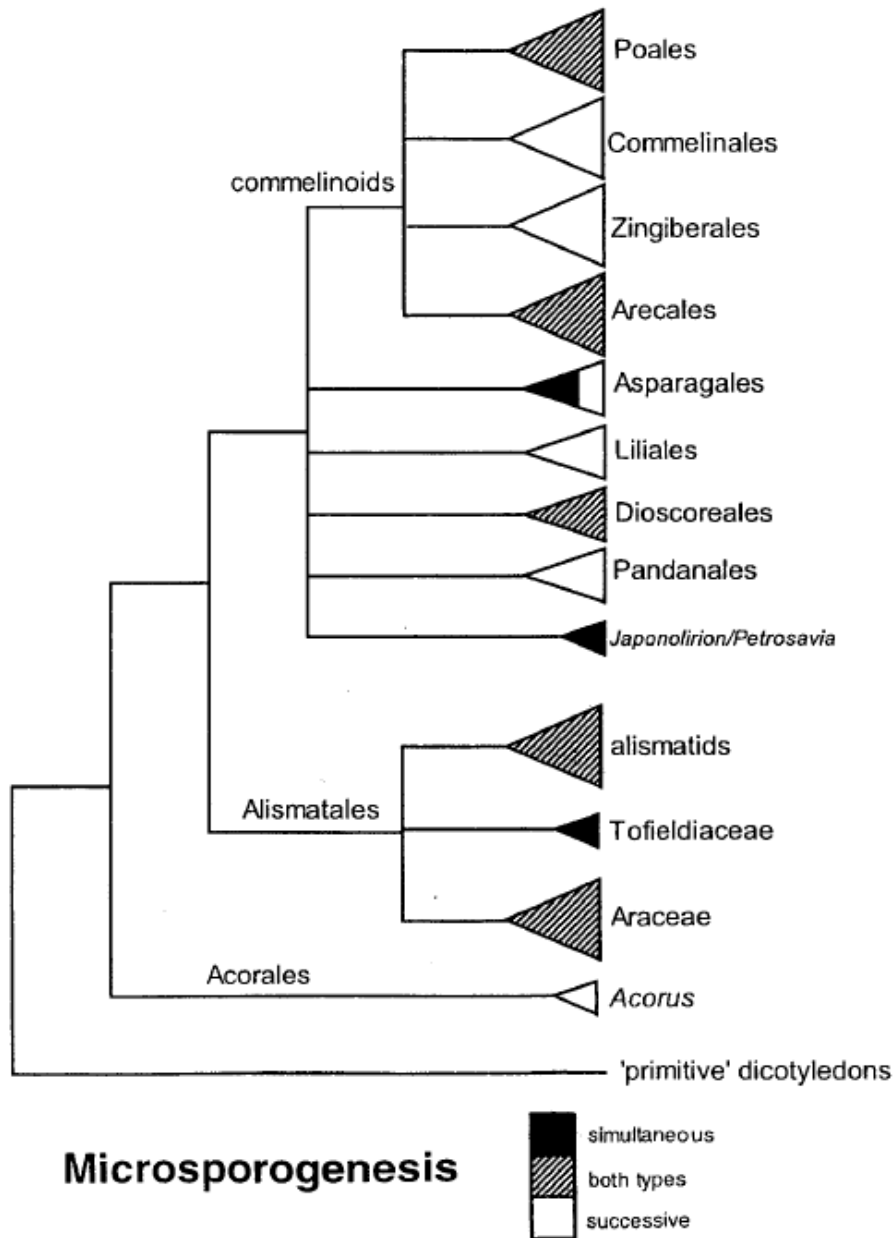


Figura 26. Relación entre los clados principales de monocotiledóneas y tipo de microsporogénesis que presentan, con la clasificación del Grupo de Filogenia de Angiospermas (1998)

La microgametogénesis, que muchos autores refieren como el periodo de mitosis y el periodo vacuolar, es similar en las especies *H. wrightii*, *H. pinifolia*, *H. univervis*, *A. Antarctica* y *T. ciliatum*. Consiste básicamente en una primera mitosis, posterior a la liberación de las microsporas de la tétrada, que resulta en la formación de los núcleos de la célula vegetativa y la célula generatriz. La formación de dos vacuolas acomodan la célula generatriz en la parte apical del polen y al núcleo de la célula vegetativa al centro;



una vez dado este acomodo se forma una pared entre las dos células. Muchos autores señalan que es difícil determinar el momento en que se divide el núcleo generatriz. Para *H. pinifolia* y *H. univervis*, Yamashita (1976) señala que este se divide posiblemente en el periodo de maduración del polen. Pettitt (1980) señala que hay tres núcleos en granos de polen maduros en anteras de 10 mm de *T. ciliatum*. En *H. wrightii* la segunda mitosis del polen se realiza cuando la célula generatriz está en la punta del polen, al final de la microgametogénesis y antes de que comiencen a alargarse el polen.

El alargamiento del polen hasta alcanzar la forma filiforme es posterior a la meiosis en todos los miembros de Cymodoceaceae. La familia Zosteraceae también presenta polen filiforme, sin embargo, su alargamiento se produce antes de la meiosis (Rosenberg, 1901 en Johri et al., 1982; Pettitt y Jermy, 1975). En la familia Posidoniaceae, no se sabe cual de estos dos tipos de patrones se presenta. El número de núcleos en el grano de polen al momento de la dehiscencia es trinucleado y es constante en las especies de Cymodoceaceae. Para *Zostera*, Rosenberg (1901; en Yamashita, 1976) reporta que los granos de polen al momento de la dehiscencia son binucleados, aunque Kuo y den Hartong (2006), señalan que todos los pastos marinos presentan polen trinucleado.

En casi el 70% de las angiospermas, el polen es expulsado de la antera en etapa bicelular, el 30% restante en etapa tricelular (Marquéz-Guzmán, 2011), entre este porcentaje se encuentran todos los miembros de la familia Cymodoceaceae y otras plantas, como las de las familias Asteraceae, Caryophyllaceae y Poaceae. El tipo de polen bi o tricelular está correlacionado con varias características como las que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Cuadro comparativo de diferencias entre polen bi y trinucleado (Tomado de Marquéz-Guzmán, 2011)

Característica	Polen bicelular	Polen tricelular
Viabilidad	Prolongada	Corta
Almacenamiento	Fácil de almacenar	Difícil de almacenar
Germinación <i>in vitro</i>	Relativamente fácil	Relativamente difícil
Tasa respiratoria	Baja	Alta
Tipo de autoincompatibilidad	Gametofítica	Esporofítica

Los granos de polen filiforme presentan una delgada capa de calosa entre las células hermanas de la tétrada en *Halodule*, *Syringodium*, *Amphibolis* y *Thalassodendron*. Ducker y colaboradores (1978) mencionan que no hay un desarrollo aparente de la capa de exina en *Amphibolis* y *Thalassodendron*, y Pérez-Pacheco (2010) señala que la capa de exina en *Halodule* y *Syringodium* es de escasa a ausente, debido a esto, los granos de polen son flexibles y ninguno de ellos presenta una ornamentación visible al MEB a aumentos menores a 6500x. Sin embargo a aumentos mayores (6500x) *A. antarctica* presenta ornamentación como un patrón reticulado con anillos radiales (Ducker *et al.*, 1978). *H. wrightii* también presenta una superficie lisa a 5000x aumentos, sin embargo a mayor aumento (6500x) se observa una ornamentación verrugosa, que pudieran ser deposiciones discontinuas de exina (Pérez-Pacheco, 2010). Todos los granos de polen de los pastos marinos son inaperturados.

El polen inaperturado es común en las familias de Alismatide (Furness y Rudall, 1998). Muchos de estos taxa son acuáticos o marinos como los pastos marinos. La exina de su polen es muy reducida, presumiblemente porque el polen no está bajo la presión de desecación, como es el caso durante su traslado por el aire. En otros órdenes como los

Pandanales, los Dioscoreales, los Liliales y los Asparagales (del grupo de los Liliode) también se muestran taxa con polen inaperturado y se cree que esta característica ha surgido numerosas veces de manera independiente (Furness y Rudall, 2001). Dentro de los Commelinoides el polen inaperturado (omniaperturado) ocurre en algunas Bromeliaceae (Halbritter, 1992), algunas Xyridaceae (Carlquist, 1960), una especie de Arecaceae, *Pigafetta* (Harley, 1996), *Hanguana* (Linder y Ferguson, 1985) y varios Zingiberales.

Las vacuolas así como gran cantidad de almidón en el polen maduro también parecen ser una característica común en la mayoría de los pastos marinos, se presenta en todos los miembros de la familia Cymodoceaceae. La gran cantidad de reservas almacenadas en un grano de polen podría significar varias cosas: 1 que tarda mucho tiempo en germinar una vez que llega al estigma; 2 que el tubo polínico tarda mucho tiempo en desplazarse a través del estilo y llegar al óvulo. En ambos casos, el grano de polen tendría que hacer uso de sus reservas para mantenerse viable.

La microsporogénesis y microgametogénesis son procesos altamente conservado entre los miembros de la familia Cymodoceaceae (Tabla 4); el desarrollo de *H. wrightii* es muy parecido a las especies de *Amphibolis*, *Syringodiuyum* y *Thalassodendron*. En *H. pinifolia* y *H. uninervis*, Yamashita (1978), menciona que la microsporogénesis y microgametogénesis no presentan diferencias en las dos especies, por lo que las aborda como una misma. Esta falta de diferenciación entre *H. pinifolia* y *H. uninervis* es apoyada por Waycott (no publicado; en Waycott *et al.*, 2006) que analiza a *H. wrightii*, *H. pinifolia* y *H. uninervis* con marcadores nucleares ITS (nrDNA) y desarrollan un filograma de parsimonia, en el que solo se diferencian dos taxa, uno es *H. wrightii* y el otro esta conformado por *H. uninervis* y *H. pinifolia*, que no presentan diferencias genéticas entre

ellas. Les y colaboradores (1997) utilizando trnL (cpDNA) encuentran un traslape considerable entre las poblaciones de *H. wrightii*, *H. pinifolia* y *H. uninervis*.

Las condiciones y relaciones ecológicas generalmente estables de los ambientes marinos podrían explicar porqué las especies de *Halodule* muestran poca variación, sin embargo, la formación del Istmo de Panamá fue un evento de gran impacto que separó las especies del Indo-Pacífico y del Atlántico Tropical hace 3 millones de años, originando la especiación entre el Atlántico y el Pacífico tropical. No obstante el largo periodo de separación geográfica, es poca la variación que se observa entre especies gemelas a ambos lados del continente (e.g. *H. uninervis*, *Syringodium isoetifolium*, *Thalassia hemprichii*, del Indo-Pacífico y *H. wrightii*, *Syringodium filiforme*, *Thalassia testudinum*, del Atlántico tropical, respectivamente). La microsporogenesis y mcrogametogensisi de *H. wrightii* son iguales a las descritos por Yamashita (1978) para *H. uninervis*. Por lo que se deduce que el desarrollo embrionario de las anteras es un carácter altamente conservado sin variación aparente, constituyendo un proceso de adaptación a la vida marina exitosa que se ha mantenido casi sin alteración.

Tabla 4. Características del desarrollo de la parte masculina de diferentes pastos marino con polen filiforme. Los números entre ( ) son los trabajos donde se encuentra la información señalada y corresponden a la siguiente bibliografía: 1. Ducker *et al.*, 1978; 2. Emberger, 1960, en Johri *et al.*, 1992; 3. Furness y Rudall, 1999; 4. McConchie y Knox, 1989; 5. Pettitt, 1981; 6. Pettitt y Jermy, 1975; 7. Pettitt *et al.*, 1984; 8. Rosenberg, 1901 en Johri *et al.*, 1992; 9. Stewart y Rüdénberg, 1980; 10. Tomlinson y Posluszny, 1978; 11. Wong R. viva voz; 12. Yamashita, 1976 1 (\*en este mismo estudio el autor también revisa *H. pinifolia*, sin embargo, no encuentra diferencias entras estas dos especies, por lo que las trata como una misma)

Familia	Especie	Flor	Forma de las Células Madres de las Microsporas	Tipo de tétrada	Sitio de la primera mitosis del polen	Capas del tapete
<i>Cymodoceaceae</i>	<i>Halodule wrightii</i>	Dioica con flor solitaria	Elíptica	Isobilateral	En el centro	Dos
	<i>Halodule uninervis</i> (12*)	Dioica con flor solitaria	Elíptica	Isobilateral	En el centro	Tres
	<i>Cymodocea nodosa</i> (2)	Dioica con flor solitaria	-----	Isobilateral	-----	-----
	<i>Syringodium filiforme</i> (10)	Dioica con inflorescencia Cimosa	Elíptica	Isobilateral	-----	Dos a tres
	<i>Amphibolis antarctica</i> (1)	Dioica con flor solitaria	Elíptica	Isobilateral	En el centro	Cuatro
	<i>Thalassodendron ciliatum</i> (5)	Dioica con flor solitaria	Elíptica	Isobilateral	En un extremo (3)	-----
<i>Posidoniaceae</i>	<i>Posidonia australis</i> (4)	Bisexual con inflorescencia racemosa	-----	-----	-----	-----
<i>Zosteraceae</i>	<i>Zostera marina</i> (6)	Monoica con inflorescencia unisexual (espata-espádice)	Filiforme	2 diadas con granos de polen paralelos	En el centro	-----
	<i>Phyllospadix torreyi</i> (9)	Dioica con inflorescencia (espata-espádice)	Filiforme	2 diadas con granos de polen paralelos	En el centro	-----

Continuar  
características

Tabla 4. Continuación. Características del desarrollo de la parte masculina de diferentes pastos marino con polen filiforme

Momento en el que se rompe el tapete	Momento en el que se degrada el tapete	Alargamiento del polen	Forma del grano de polen	Número de núcleos en el grano maduro de polen	Tipo de apertura del polen	Exina en polen	Acomodo del polen en la antera	Reservas de almidón en el polen maduro
Antes de la meiosis	En la etapa de maduración del polen	Después de la microgametogénesis, en la etapa de maduración	Filiforme	Tres	Inaperturado	Reducida (8)	Enrollados sobre si mismo y acomodados aleatoriamente	Si
Antes de la meiosis	Cuando el polen es maduro	Después de la microgametogénesis, en la etapa de maduración	Filiforme	Tres	Inaperturado	-----	Retorcido acomodado irregularmente	Si
-----	-----	-----	Filiforme	-----	-----	-----	-----	Si
Muy poco antes de la meiosis (11)	En granos de polen jóvenes	-----	Filiforme	Tres	Inaperturado	-----	-----	Si
Al final de la meiosis	En la maduración del polen	-----	Filiforme	Tres	Inaperturado	Ausente	Enroscados en espiral	Si
Antes de la meiosis	Pocas anteras presentan residuos del periplasmodio que se adhiere al polen	-----	Filiforme	Tres	Inaperturado	Ausente	Enroscados en espiral (1)	Si
			Filiforme			Ausente		
-----	-----	Desde antes de la microgametogénesis hasta la etapa de maduración (8)	Filiforme	Dos	Inaperturado (3)	Ausente (7)	Paralelos entre si	Si
-----	-----	Desde antes de la microgametogénesis hasta la etapa de maduración	Filiforme	Tres	-----	-----	Paralelos entre si	-----

## CONCLUSIONES

- ✚ La morfología floral de *Halodule wrightii* esta definida por dos anteras tetraesporangiadas fusionadas, las cuales están envueltas por 1 brácteas y 1 hoja envolvente del tallo.
- ✚ La pared de la antera consta de epidermis, endotecio, dos capas medias y tapete plasmodial biestratificado. Cada teca presenta una línea de dehiscencia, la cual cuenta con células de pared delgada en el estomio, que permiten la dehiscencia de la antera.
- ✚ El tapete plasmodial se rompe y queda contenido en el lóculo en etapas muy tempranas de la antera.
- ✚ El tipo de meiosis es sucesiva y genera tétradas isobilaterales.
- ✚ El desarrollo de las flores masculinas del género *Halodule* es un proceso muy conservado, pues el desarrollo de las especies que se han estudiado es similar.
- ✚ El polen maduro es filiforme, trinucleado y con una ligera ornamentación verrugosa.
- ✚ En la antera madura los granos de polen se enrollan sobre si mismos y forman un grupo compacto acomodado de forma aleatoria.
- ✚ Cada antera de la flor masculina presentan un haz vascular, los cuales se fusionan en la parte media de la flor.

## Apéndice A

### Remoción de mucílago con enzimas

Se realizaron los siguientes pasos:

1. Se lavaron las anteras, previamente fijadas en FAA, con agua desionizada por 1 h.
2. Se mezcló 50µl de Macerex (celulasa/pectinasa) con 100 ml de buffer (amortiguador de fosfato potasio a pH 7).
3. Se disectaron anteras maduras y se extrajo el polen.
4. Se colocó el polen en un tubo ependorf hasta aproximadamente 0.25ml y se le agregó 1 ml de la solución (Macerex-buffer) y se incubó a 37°C por 30 min
5. Se centrifugó a 1000 RPM por 3 min para precipitar el polen y tratar de separar la mayor cantidad de solución.
6. Se quitó la solución y se reemplazó por nueva.
7. Se incubó a 37°C por 15 min.
8. Se centrifugó a 1000 RPM por 3 min para precipitar el polen y tratar de separar la mayor cantidad de solución.
9. Se quitó la solución y se enjuagó con agua desionizada.
10. Las muestras se deshidrataron en serie gradual de alcoholes, se procesaron para MEB, se observaron y fotografiaron.

El mismo procedimiento fue realizado pero en una solución de Celulasa - glucosidasa - carboximetil celulasa – glucosidasa – xilanasa (1:1:1:1:1) y buffer de acetatos a pH5.



## Apéndice B

### Inclusión en LR-White

La inclusión en LR-White se realizó como se menciona a continuación:

1. Deshidratación. Las muestras en FAA se lavaron en agua corriente durante 2 hrs y posteriormente se deshidrataron en una serie gradual de disoluciones de etanol al 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100% por 1 h en cada uno.
2. Infiltración. Las anteras fueron embebidas en 4 concentraciones de LR-White: etanol 100% (1:3, 1:1, 3:1 y 1:0) por una hora cada una, después se colocaron en resina de LR-White al 100% por 24 hrs a 4°C.
3. Inclusión. Las muestras se incluyeron en cápsulas de gelatina con LR-White puro y se colocaron en la estufa a 56°C por 12 hrs para su polimerización. Se utilizó el ultramicrotomo con cuchillas de vidrio para obtener cortes semifinos de 1µm de espesor. Las láminas obtenidas se fijaron y montaron en portaobjetos por medio de calor, y se tiñeron con azul de toluidina. Por último se hizo una selección de los mejores cortes y se fotografiaron con microscopia de campo claro y de contraste de fases.

## Apéndice C

### Inclusión en Parafina

La inclusión en Parafina se realizó como se menciona a continuación:

1. Deshidratación. Las muestras en FAA se lavaron en agua corriente durante 2 hrs y posteriormente se deshidrataron en una serie gradual de disoluciones de etanol al 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100% por 1 h en cada uno.
2. Inclusión. El material deshidratado se transfirió a una mezcla de xilol-parafina 2:1, xilol-parafina 1:1 y xilol-parafina 1:2 cada una por un periodo de 12 hrs dentro de una estufa a una temperatura de 58° C. Después las muestras se pasaron por dos cambios de paraplast puro durante 24 hrs cada una y se incluyeron en moldes cúbicos de metal.
3. Obtención de cortes. Se obtuvieron cortes longitudinales y transversales de 8µm de grosor por microtómo de rotación, los cuales se montaran en portaobjetos. Se observaron las muestras al microscopio de luz y se escogieron las mejores.
4. Desparafinación. Los cortes obtenidos se colocaron en la estufa a 58° C durante 30 min. y posteriormente se sometieron a 3 cambios de xilol puro y 1 de xilol-etanol. Por último se hidrataron en una serie de disoluciones etanólicas al 96%, 85%, 70%, 50%, 30%, durante 3 min en cada una y se transfirieron a agua corriente (se hidrata solo a la concentración del solvente en que esté preparado el colorante).

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ackerman J. 2006. Sexual Reproduction of seagrasses: pollination in the marine contex. *In*: Larkum AW., RJ. Orth y CM. Duarte (eds.). Seagrasses: biology, ecology and conservation. Springer. Holanda. 89-109 pp.
- APwebsites. 2008. Página en red: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>
- Arber A. 1920. Water plants. A study of acuatic Angiosperms. Cambridge University Press. Cambridge.
- Arber A. 1925. Monocotyledons. A morphological study. Cambridge University Press. Cambridge.
- Ascherson PFA. 1871. Die geographische Verbreitung der Seegräser. *Petermans Geographische Mittheilungen* 17(7): 241-248.
- Bailey J. 2003. The Facts on File Dictionary of Botany. Facts On File, Inc. Nueva York. 250 pp.
- Balestri B. y S. Bertini. 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aquatic Botany* 76: 291-297.
- Barrett S., C. Eckert y B. Husband. 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany* 44: 105–145.
- Becker P. 1984. Tannin structure and function: keeping our perspective. *The American Naturalist* 124(1): 134-136.
- Bell A. y A. Bryan. 2008. Plant Form: an illustrated guide to flowering plant morphology. Timber Press. Londres. 41 pp.
- Bennett R. y R. Wallsgrove. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanism. *New Phytol.* 127: 617-633.
- Bragg HL. y C. McMillan. 1987. SEM Comparison of fruits and seeds of *Syringodium filiforme* (Cymodoceaceae) from Texas, U.S. Virgin Islands, and the Philippines. *Contributions in Marine Science* 30: 91-103.
- Caye C. y A. Meinesz. 1986. Experimental study of seed germination in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* 26: 79-87
- Cambridge M. y A. McComb. 1984. The loss of seagrass from Cockburn Sound, Western Australia. The time course and magnitude of seagrass decline in relation to industrial development. *Aquatic Botany* 20: 229-243.
- Carlquist S. 1960. Anatomy of Guayana Xyridaceae: *Abolboda*, *Orectanthe*, and *Achlyphila*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 10: 65-117.
- Cheah CH. y BC. Stone. 1975. Embryo sac and microsporangium development in *Pandanus* (Pandaneaceae). *Phytomorphology* 25: 228-238.

- Clark S. y H. Kirkman. 1988. Biology of Seagrasses: a treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region. *In*: Larkum AW., AJ. McComb y SA. Shepherd (eds.). Elsevier. Amsterdam.
- Coles R., L. McKenzie y S. Campbell. 2003. The seagrasses of eastern Australia. *In*: Green EP., FT. Short y MD. Spalding (eds.). The World Atlas of Seagrasses: present status and future conservation. University of California Press. 131-147 pp.
- CONANP. 2000. Página en red: [http://www.conanp.gob.mx/que\\_hacemos/pdf/programas\\_manejo/puerto\\_morelos.pdf](http://www.conanp.gob.mx/que_hacemos/pdf/programas_manejo/puerto_morelos.pdf)
- Costanza R., R. Árgel, R. de Groot, S. Farber, M. Grasso, B. Hannon, K. Limburg, S. Naeem, R. Óneill, J. Paruelo, R. Raskin, P. Sutton y M. van der Belt. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253–260.
- Cook CDK. 1988. Wind pollination in aquatic angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 768-777.
- Creed J. 2003. The seagrasses of South America: Brazil, Argentina, and Chile. *In*: Green EP., FT. Short y MD. Spalding (eds.). The World Atlas of Seagrasses: present status and future conservation. University of California Press. 243–250 pp.
- Den Hartog C. 1987. Wasting disease and other dynamic phenomena in *Zostera* beds. *Aquatic Botany* 27: 3-14
- Den Hartog C. 1970. The Sea-Grasses of the World. Publishing North-Holland Co., Amsterdam. 275 pp.
- Den Hartog C. y J. Kuo. 2006. Taxonomy and biogeography of seagrasses. *In*: Larkum AW., RJ. Orth y CM. Duarte (eds.). Seagrasses: Biology, ecology and conservation. Springer. Holanda. 1-23 pp.
- De Kroon H. y R. Kwant. 1991. Density-dependent growth responses in two clonal herbs: Regulation of shoot density. *Oecologia* 86:298-304.
- Ducker S., M. Pettit y B. Knox. 1978. Biology of Australian Seagrasses: Pollen Development and Submarine Pollination in *Amphibolid antarctica* and *Thalassodrendrom ciliatum* (Cymodoceaceae). *Australian Journal of Botany* 26: 265-285.
- Eklöf J., M. de la Torre-Castro, M. Gullström, J. Uku, N. Muthiga, T. Lyimo y S. Bandeira. 2008. Sea urchin overgrazing of seagrasses: A review of current knowledge on causes, consequences, and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79: 569–580.
- Esau K. 1977. Anatomía vegetal. Editorial Omega. España. 779 pp.
- Fahn A. 1990. Plant Anatomy. 4a edición. Pergamon Press. Nueva York. 145 pp.
- Fenical W. 1988. Marine plant-Herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 111-145.

- Furness C. y P. Rudall. 1998. The tapetum and systematics in monocotyledons. *Botanical Review* 64: 201- 239.
- Furness C. y P. Rudall. 1999. Inaperturate pollen in monocotyledons. *International Journal of Plant Sciences* 160: 395–414.
- Furness C. y P. Rudall. 2000a. The systematic significance of simultaneous cytokinesis during microsporogenesis in monocotyledons. *In: Wilson KL. y DA. Morrison (eds.). Systematics and evolution of monocots.* CSIRO Publishing, Melbourne. 186 - 190 pp.
- Furness C. y P. Rudall. 2000b. Aperture absence in pollen of monocotyledons. *In: Harley MM., CM. Morton y S. Blackmore (eds.). Pollen and spores: morphology and biology.* Royal Botanic Gardens, Kew. 249 - 257 pp.
- Furness C. y P. Rudall. 2001. Pollen and anther characters in monocot systematics. *Grana* 40: 17 – 25.
- Fonseca M. y J. Cahalan. 1992. A preliminary evaluation of wave attenuation by 4 species of seagrass. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 35: 565–576.
- Green E. y F. Short. 2003. *World Atlas of Seagrasses.* vol. 1. University of California Press. Berkeley. 286 pp.
- Gullström M., M. de la Torre Castro, S. Bandeira, M. Björk, M. Dahlberg, N. Kautsky, P. Rönnbäck y M. Omán. 2002. Seagrass ecosystems in the Western Indian Ocean. *Ambio* 31: 588–596.
- Gutiérrez M., M. de la Fuente y A. Cervantes. 2000. Biomasa y densidad de dos especies de pastos marinos en el sur de Quintana Roo, México. *Revista de Biología Tropical* 48: 313-316.
- Guzmán T. 2009. Desarrollo del fruto y semilla, banco de semillas y germinación *Syringodium filiforme* Kütz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Halbritter H. 1992. Morphologie und systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae. *Grana* 31: 197- 212.
- Harley M. 1996. Palm pollen and the fossil record. Tesis para obtener el título de doctorado. Universidad del este de Londres. Inglaterra.
- Hartnett DC. y FA. Bazzaz. 1985. The genet and ramet population dynamics of *Solidago Canadensis* in an abandoned field. *Journal of Ecology* 73: 407-413.
- Heck K. y T. Thoman. 1984. The nursery role of seagrass meadows in the upper and lower reaches of the Chesapeake Bay. *Estuaries* 7: 70–92.
- Jiménez K. 2004. Desarrollo y dispersión de frutos y semillas de *Thalassia testudinum* Banks Ex König (Hydrocharitaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

- Johri BM., KB. Ambegaokar y PS. Srivastava. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. Nueva York. 1221pp.
- Kuo J. y C. Den Hartog. 2000. Seagrasses: A profile of an ecological Group. Biol. Mar. Medit. 7(2): 3-17
- Kuo J. y C. Den Hartog. 2006. Seagrass Morphology, Anatomy, and Ultrastructure. *In*: Larkum AW., RJ. Orth y CM. Duarte (eds.). Seagrasses: biology, ecology and conservation. Springer. Holanda. 51-87 pp.
- Kuo J. y A. McComb. 1989. Seagrass taxonomy, structure and development. *In*: Larkum AW., AJ. McComb y SA. Shepherd (eds.). Biology of Seagrasses: a treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region. Elsevier. Amsterdam. 6-73 pp.
- Kuo J. y A. McComb. 1998. Cymodoceaceae. *In*: Kubitzki K(ed.). The families and genera of vascular plants, vol. 3. Flowering plants, Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer Verlag Berlin. 133-139 pp.
- Kuo J. y H. Kirkman.1992. Fruits, seeds and germination in the seagrass *Halophila ovalis* (Hydrocharitaceae). Botanica Marina 35: 197-204.
- Lanyon J. 1986. Seagrasses of the Great Barrier Reef. Great Barrier Reef Marine Park Authority, Special Publication Series 3. Australia. 54 pp.
- Larkum AW., RJ. Orth y CM. Duarte. 2006. Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Springer. Holanda. 691pp.
- Less DH. 1988. Breeding systems, population structure, and evolution in hydrophilous angiosperms. Annals of the Missouri Botanical Garden 75: 819-835.
- Les DH., M. Claland y M. Waycott. 1997. Phylogenetic Studies in Alismatidae, II: Evolution of marine Angiosperms (Seagrasses) and Hydrophily. Systematic Botany 22 (3): 443-463.
- Linder HP. y IK. Ferguson. 1985. Notes on the pollen morphology and phylogeny of the Restionales and Poales. Grana 24: 65-76.
- Lobban C. y J. Harrison.1997. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press. USA. 366pp.
- López-Curto M., J. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. 2ª edición. Las prensas de ciencias, UNAM. México. 178 pp.
- Marine seagrasses. 25 de marzo de 2009. Página en red: <http://waynesword.palomar.edu/seagrass.htm>
- Márquez-Guzmán J. 2011. Desarrollo del Androceo. *In*: Biología de Angiospermas. Las prensa de ciencias. México.
- McCochine CA. y RB. Knox. 1989. Pollination and reproductive biology of seagrasses. *In*: Larkum AW., AJ. McComb y SA. Shepherd (eds.). Biology of

Seagrasses: a treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region. Elsevier. Amsterdam. 74-111 pp.

- McKenzie LJ. Y SJ. Campbell. 2002. Manual for Community (citizen) Monitoring of Seagrass Habitat. Western Pacific Edition QFS, NFC. Australia. 43pp. Disponible en red: [http://www.seagrasswatch.org/MethodsManuals/SeagrassWatchWesternPacific\\_Manual.pdf](http://www.seagrasswatch.org/MethodsManuals/SeagrassWatchWesternPacific_Manual.pdf)
- McKenzie LJ., WJ. Lee Long, RG. Coles y CA. Roder. 2000. Seagrass-Watch: Community based monitoring of seagrass resources. *Biol. Mar. Medit.* 7(2): 393-396.
- Muhlia-Montero M. 2011. La herbivoría de las flores masculinas de tres especies de 4 pastos marinos en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Noble JC., AD. Bell y JL. Harper. 1979. The population biology of plants with clonal growth: I. The morphology and structural demography of *Carex arenaria*. *Journal Ecology*: 67: 983-1008.
- Pérez-Pacheco M. 2010. Ultraestructura de la exina en granos de polen en pastos marinos del Caribe. Trabajo de investigación para obtener el diplomado de: especialista en microscopía electrónica. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Pettitt JM. 1980. Reproduction in seagrasses: nature of the pollen and receptive surface of the stigma in the Hydrocharitaceae. *Annals of Botany* 45: 257-271.
- Pettitt JM. 1981. Reproduction in seagrasses: pollen development in *Thalassia hemprichii*, *Halophila stipulacea* and *Thalassodendron ciliatum*. *Annals of Botany* 48: 609-622.
- Pettitt JM. 1984. Aspects of flowering and pollination in marine angiosperms. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 22: 315-342.
- Pettitt J. y A. Jermy. 1975. Pollen in hydrophyllous angiosperms. *Micron* 5: 377-405.
- Pettitt J., S. Ducker y B. Knox. 1991. Submarine pollination. *Sci. Am.* 244: 92-100.
- Phillips J. 1967. On Species of the Seagrass *Halodule* in Florida. *Bulletin of Marine Science* 17: 672-676.
- Phillips R. y E. Meñez. 1988. Seagrasses. Smithsonian Institution Press. Washington. 104 pp.
- Philbrick C. y D. Less. 1996. Evolution of Aquatic Angiosperm Reproductive systems. *BioScience* 46: 813-822.
- Poiner I., D. Walker y R. Coles. 1989. Regional studies: seagrasses of tropical Australia. *In*: Larkum AW., AJ. McComb y SA. Shepherd (eds.). *Biology of Seagrasses: a treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*. Elsevier. Amsterdam. 279-303 pp.

- Reed J. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73: 1516-1528.
- Reusch T. 2001. Fitness-consequences of geitonogamous selfing in a clonal marine angiosperm (*Zostera marina*). *Journal Evolutionary Biology* 14:129–138.
- Rudall P. y C. Furness. 1997. Systematics of *Acorus*: ovule and anther. *International Journal of Plant Sciences* 158: 640-651.
- Rudall P., C. Furness, M. Chase y M. Fay. 1997. Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Lilianaes). *Canadian Journal of Botany* 75: 408-430.
- Ronse De Craene L.P. 2007. Are petals sterile stamens or bracts? The origin and evolution of petals in the core eudicots. *Annals of Botany* 100: 621-630.
- Ronse De Craene LP. 2010. *Floral Diagrams*. Cambridge University Press. Reino Unido. 441 pp.
- Rosenbergo. 1901. Über die Embryologie von *Zostera marina* L. Bihang Till K. Srenska Vet. Arad Handlingar 27: 3-24
- Schmidt L. y D. Joker. 2001. *Glossary of seed biology and technology*. Danida Forest Seed Centre. Dinamarca. 35 pp.
- Sculthorpe C. 1985. *The biology of aquatic vascular plants*. Edward Arnold, London. Reinpresión ed, Koeltz Scientific Books. Alemania. 610 pp.
- Short F., T. Carruthers, W. Dennison y M. Waycott. 2007. Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 350: 3-20.
- Short F. y S. Wyllie-Echeverría. 1996. Natural and human-induced disturbances of seagrass. *Environ. Conserv.* 23: 17-27.
- Short FT., *et al.* 2011. Extinction risk assessment of the world's seagrass species. *Biological Conservation* 144 (7):1961-1971.
- Stoner A. 1980. The role of the seagrass biomass in the organization of benthic macrofaunal assemblages. *Bull. Mar. Sci.* 30: 537-551.
- Stewart JG. y L. Rüdénberg. 1980. Microsporocyte growth and meiosis in *Phyllospadix torreyi*, a marine monocotyledon. *American journal of Botany* 67: 949-954.
- Royal Botanical Garden Kew. 2010. Página en red: <http://www.kew.org/>
- Tyerman, S.D. Solote and water relations of seagrasses. *In*: Larkum AW., AJ. McComb y SA. Shepherd (eds.). *Biology of Seagrasses: a treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*. Elsevier. Amsterdam. 723-754 pp.



- Tiwari SC. Y BE. Gunning. 1986. Development of tapetum and microspores in *Canna* L.: an example of an invasive but non-syncytial tapetum. *Annals of Botany* 57: 557-563.
- Tcherkez G. 2004. *Flowers: Evolution of the Floral Architecture of Angiosperms*. Science Publishers, Inc. Nueva York. 182 pp.
- Tomlinson PB. 1974. Vegetative morphology and meristem dependence. The foundation of productivity in seagrasses. *Aquaculture* 4: 107-130.
- Tomlinson PB. 1982. *Anatomy of the Monocotyledons. VII. Helobiae (Alismatidae)*. Clarendon Press. Oxford. 559 pp.
- Tomlinson PB. y U. Posluszny. 1978. Aspects of floral morphology and development in the seagrass *Syringodium filiforme* (Cymodoceaceae). *The Botanical Gazette* 139: 333-345.
- Thorhaug A. 1986. Review of seagrass restoration efforts. *Ambio* 15: 110-117.
- Van Tussenbroek B., C. Galindo y J. Márquez-Guzmán. 2000. Dormancy and foliar density regulation in *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany* 68: 281–295.
- Van Tussenbroek B., R. Wong, y J. Márquez-Guzmán. 2008. Synchronized anthesis and predation on pollen in the marine angiosperm *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Marine Ecology Progress Series* 354: 119–124.
- Van Tussenbroek B., J. Márquez-Guzmán y R. Wong. 2009. Phenology of marine angiosperms (seagrasses): Reproductive synchrony in the sea. *In: Gamboa-de Buen A., A. Orozco-Segovia y F. Cruz-García (eds.). Functional Diversity of Plant Reproduction*. Trivandrum. India 695 pp
- Van Tussenbroek B., M. Barba, R. Wong, K. van Dijk y M. Waycott. 2010. *Guía de los pastos marinos tropicales del Atlántico oeste*. UNAM, ICyL. México. 80 pp.
- Waycott M., G. Procaccini, D. Les y T. Reusch. 2006. Seagrass Evolution, Ecology and Conservation: A Genetic Perspective. *In: Larkum AW., RJ. Orth y CM. Duarte (eds.). Seagrasses: biology, ecology and conservation*. Springer. Holanda. 25-50 pp.
- Williams S. 1990. Experimental Studies of Caribbean Seagrass Bed Development. *Ecol. Monographs* 60 (4): 449-469.
- Wilson W. y L. Harder. 2003. Reproductive uncertainty and the relative competitiveness of simultaneous hermaphroditism versus dioecy. *Am Nat* 162 (33):220–241.
- Yamashita T. 1976. Über die Pollenbildung bei *Halodule pinifolia* und *H. uninervis*. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen* 52: 217–226.
- Warren-Morris D. y M. Zetina-Morris. 2002. *English-Spanish Dictionary of Plant Biology*. Cambridge International Science Publishing. Inglaterra. 647pp.