



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estructura de los meristemos durante la germinación y
primeras etapas del desarrollo de *Vanroyenella*
plumosa (Podostemoideae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Nancy Vianey Mejía López



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

1. Mejía
López
Nancy Vianey
5528160053
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309136994
2. Doctora en Ciencias
Márquez
Guzmán
Guadalupe Judith
3. Doctora en Ciencias
Gordillo
Martínez
Martha Juana
4. Doctora en Ciencias
Collazo
Ortega
Margarita
5. Doctora en Ciencias
Jiménez
Durán
Karina
6. Maestra en Ciencias
Pérez
Pacheco
Mónica
Karina
7. Estructura de los meristemos durante la germinación y primeras etapas del desarrollo de *Vanroyenella plumosa* (Podostemoideae).
p
2018

Esta investigación se realizó gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, IN213015 Estudios reproductivos en clados Neotropicales de la familia Podostemaceae.

Agradecimientos

A mi familia, que me apoya en todo momento, incluso en la loca decisión de estudiar Biología.

A mi mamá Soco, por siempre estar conmigo, a su manera.

A ti, Eduardo, qué sería de mí sin tu apoyo. Gracias por levantarme el ánimo siempre, y esperarme cuando cortaba hasta tarde.

A mis amigos, que quiero tanto: Brenda, Almita (Waluz), Gustavo, Marco, Abraham.

A mi hermana Claudia, gracias por siempre creer en mí.

Al Laboratorio de Biología de Desarrollo en Plantas por permitirme realizar esta tesis.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por la paciencia (que fue bastante), por las enseñanzas y el apoyo incondicional.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco por la ayuda en el laboratorio y las correcciones a este trabajo.

A la Dra. Karina Jiménez Durán por las revisiones y por los consejos.

Al M. en C. Ricardo Wong, por la ayuda en el laboratorio y por siempre estar buen humor.

A la Dra. Margarita Collazo Ortega, gracias por las correcciones y por las enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio.

A todos los profesores del Taller “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes”

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco por el apoyo en la observación y toma de micrografías en el microscopio electrónico de barrido.

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

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

A la M. en C. Patricia Ollguín por permitirme usar las cámaras de germinación.

A los chicos Jutihtáceos Vera, Ulises, Whalee, Maru, Anahí y a todo los chicos del DesPlant.

A todos los que directa e indirectamente influyeron en mi formación.

A mi amada Universidad

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	3
Familia Podostemaceae	3
Filogenia de la familia.....	5
Meristemas	7
Clasificación de los meristemas	7
Meristemo Apical del talo	8
Meristemo de la raíz (Subapical)	10
Características de las células meristemáticas.....	10
Meristemas en la familia	11
Expresión génica en los meristemas de las podostemáceas.....	14
<i>Vanroyenella</i>	15
Descripción taxonómica	17
Justificación.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos particulares.....	19
Metodología.....	20
Resultados.....	22
Morfología.....	22
Anatomía.....	25

Ultraestructura	31
Discusión.....	33
Conclusiones.....	38
Perspectivas.....	38
Bibliografía.....	39
Anexo.....	44

Resumen

En la familia Podostemaceae, subfamilia Podostemoideae las plántulas se desarrollan en ausencia de meristemos embrionarios apicales y subapicales evidentes. Estos patrones de desarrollo se describieron en especies asiáticas y australianas y existe solo un trabajo donde se estudian los meristemos de una especie americana: *Marathrum rubrum*. Por lo que este trabajo aborda el desarrollo de las plántulas de *Vanroyenella plumosa*, una especie endémica de México, desde el punto de vista de la estructura y ultraestructura de los meristemos. Se colectaron semillas el Río Horcones, municipio de Cabo Corrientes, en el estado de Jalisco, México y se germinaron para seguir el desarrollo mediante cortes histológicos en el microscopio fotónico y para su observación en MET.

Los embriones y las plántulas de *V. plumosa* no presentan estructuras meristemáticas evidentes, tanto en el polo apical ni el subapical. Entre los cotiledones se desarrollan dos primordios de hojas a partir de un meristemo críptico. Este patrón de desarrollo es similar a otras especies de la subfamilia Podostemoideae incluyendo a la especie americana *M. rubrum*.

Introducción

Las plantas de la Familia Podostemaceae viven adheridas a rocas en ríos de corrientes rápidas o en caídas de agua. Presentan un cuerpo vegetativo aplanado tipo taloide, que sin duda es una adaptación a las fuertes corrientes de su entorno y les permite abarcar más superficie para la absorción de nutrientes (Uniyal y Tandon, 2017). Su ciclo de vida presenta la etapa vegetativa sumergida y la etapa reproductiva aérea (Philbrick y Novelo 1995; Rutishauser, 1997).

Estudios en especies de las tres subfamilias de Podostemaceae sugieren que la absorción del crecimiento vertical puede estar relacionado con la pérdida o reducción de los meristemas embrionarios (Rutishauser, 1997; Moham Ram y Sehgal, 1997; Susuki *et al.* 2002) por lo que algunas especies presentan embriones con meristemas apical y subapical reducidos o no evidentes. En algunas especies de subfamilia Tristichoideae hay embriones con un meristemo apical con la estructura típica de las angiospermas: túnica-corpor, y un meristemo subapical. En cuanto a la subfamilia Weddellinoideae, estos presentan meristemo apical pero no es evidente un meristemo subapical. Las especies de la subfamilia Podostemoideae no se observan meristemas apicales y subapicales evidentes (Katayama *et al.*, 2011).

Los estudios sobre la presencia o ausencia de los meristemas en los embriones de las podostemáceas se han realizado principalmente en especies asiáticas de las subfamilias Podostemoideae y Tristichoideae. Este es el segundo trabajo que se realiza en una especie americana de la subfamilia Podostemoideae.

Antecedentes

Familia Podostemaceae

La Familia Podostemaceae es la más grande de las angiospermas acuáticas estrictas (Philbrick y Novelo, 1995), con de 49 géneros y cerca de 280 especies (Philbrick y Novelo, 1998; Cook y Rutishauser, 2007), agrupadas en tres subfamilias: Tristichoideae, Podostemoideae y Weddellinoideae (Tippery *et al.*, 2011; Ruhfel *et al.*, 2011; Koi *et al.*, 2012).

Crece en ríos de corriente rápida o cascadas en los trópicos y subtropicos en todo el mundo y raramente en regiones templadas (Cook y Rutishauser, 2007; Kato, 2016). Estas plantas se encuentran restringidas a ríos donde el nivel de agua sube o baja estacionalmente. Las plantas se encuentran adheridas a la superficie de rocas sumergidas en la época de lluvia, donde se desarrolla la fase vegetativa, al comienzo de la época seca las plantas forman yemas florales bajo el agua y al ser expuestas se lleva a cabo la floración y fructificación. La exposición es necesaria para la reproducción (Philbrick y Novelo, 1995; Kato, 2016).

Las podostemáceas producen numerosas semillas pequeñas, generalmente de hasta 0.3 mm, poco después del inicio de la época seca. Cuando el ambiente es húmedo, por ejemplo, al inicio de la época de lluvia, la cubierta seminal absorbe agua y se secreta mucílago que se considera el primer mecanismo de adhesión al sustrato (Philbrick, 1984). Al germinar, en la mayoría de las especies no se desarrolla una plúmula o raíz principal, en su lugar se forma una raíz adventicia que surge del lado lateral del hipocótilo que actúa como órgano principal. Esta raíz

adventicia de adhiere a la superficie de las rocas, formando brotes adventicios en el lado dorsal o los laterales dando como resultado un plan corporal horizontal. (Philbrick 1984; Rutishauser, 1997; Suzuki *et al.*, 2002). Este cuerpo vegetativo es denominando tipo taloide debido al aplanamiento dorsiventral de las raíces, los tallos, o ambos órganos. Debido a que las corrientes son muy violentas, se encuentran fuertemente adheridas a sustratos sólidos (Philbrick y Novelo, 1995), mediante pelos adhesivos y sustancias poliméricas extracelulares secretadas por cianobacterias que se encuentran formando un biofilm en las rocas y que actúan como adherente entre la planta y el sustrato (Jägern-Zürn y Grubert, 2000).

Las flores son pequeñas y con tépalos poco atractivos, semiapétalas, probablemente anemófilas, solitarias o a veces, en inflorescencias. En algunos géneros como *Apinagia*, *Mourea*, *Ryncholacis*, las flores presentan tépalos reducidos; sin embargo, los estambres y pedicelos son coloridos, lo que atrae a insectos, éstas son anemófilas y entomófilas (Kato, 2016).

Las hojas llegan a medir hasta dos metros de longitud (*Mourea*), o incluso estar reducidas a unas cuantas micras (*Tristicha*). Hay un considerable polimorfismo a diferentes niveles taxonómicos y entre individuos (Rutishauser, 1997). Entre otros caracteres distintivos de la familia se pueden mencionar la presencia de un pseudosaco embrionario o plasmodio nuclear, ausencia de doble fecundación endospermo y de arénquima (Rutishauser, 1997; Moham Ram y Sehgal, 1997; Cook y Rutishauser, 2007).

Existe una alta incidencia de endemismo de especies en la familia. En el Nuevo Mundo el 48% de las especies se encuentran en un solo río o en un solo lugar dentro de un río (Philbrick y Novelo, 1995).

Filogenia de la familia

La clasificación filogenética de la familia se ha basado principalmente en la morfología comparada, pero la filogenia molecular no concuerda con ésta. La familia fue clasificada antiguamente en dos subfamilias Podostemoideae y Tristichoideae (Van Royen, 1951) pero análisis moleculares recientes respaldan la clasificación de Engler (1930) donde reconoce tres subfamilias; la subfamilia Podostemoideae, hermana de la subfamilia sudamericana Weddellinoideae, que antiguamente había sido asignada a la subfamilia Tristichoideae (Koi y Kato, 2001; Ruhfel *et al.*, 2011; Koi *et al.*, 2012). Filogenéticamente la subfamilia Tristichoideae diverge primero, seguido de Weddellinoideae y Podostemoideae (Figura 1; Kita y Kato, 2001, Koi *et al.*, 2012;).

La familia Podostemaceae se encuentra en el orden Malpighiales dentro de las Eudicotiledóneas, en el clado rosides II y es hermana de la familia Hypericaceae (Savolainen *et al.*, 2000; Soltis *et al.*, 2000; Gustafsson *et al.*, 2002; Ruhfel *et al.*, 2011).

Meristemos

En las plantas, como en los demás organismos, se presenta un plan corporal distintivo que se puede observar durante el desarrollo ontogenético (Sussex y Kerk, 2001). En general, las plantas vasculares se caracterizan por tener un eje embrionario con un meristemo apical y uno subapical que se encuentran en los extremos del hipocótilo, de los cuales se derivan tallos con hojas y raíces (Koi y Katayama, 2013).

Los meristemos son regiones localizadas de tejido, que por divisiones celulares adicionan nuevas células a la planta o a las partes de una planta (Beck, 2005). Estos se caracterizan por poseer células no diferenciadas y totipotenciales (Zlotnik y Ponce, 2013). Los meristemos se perpetúan a sí mismos, esto es, alguna parte de las divisiones meristemáticas no dan lugar a tejido diferenciado, sino que permanecen meristemáticas (Esau, 1965).

Clasificación de los meristemos

Los meristemos son clasificados por su localización en la planta: los **apicales**, como el del tallo y el subapical de la raíz, se encuentran localizados en la punta de cada brote y en el eje de la raíz principal, respectivamente, y contribuyen al crecimiento en longitud de la planta, los **laterales**, que contribuyen al crecimiento en diámetro y se encuentran cerca de la periferia de los ejes del tallo o raíz, como el cambium vascular y los meristemos **intercalares**, que son tejido proliferativo rodeado de tejido diferenciado, a menudo apartado del meristemo apical. Se encuentran generalmente en la base de cada entrenudo o de una hoja de monocotiledóneas (Esau, 1965; Sussex y Kerk, 2002; Zlotnik y Ponce, 2013).

Meristemo apical del tallo

El ápice del brote contribuye al crecimiento en longitud e inicia la formación de los primordios foliares. En las angiospermas, el meristemo apical vegetativo muestra una estructura en forma de domo, la llamada túnica-carpus. Este domo se puede regionalizar en tres zonas distintas por su actividad. En la mayoría de las angiospermas, las dos capas más externas (C1 y C2) (puede haber más de dos capas), se denominan colectivamente túnica, estas células se mantienen por divisiones anticlinales. El carpus (C3), la región proximal a la túnica experimenta divisiones en varias orientaciones (Figura 2); por lo que las capas externas contribuyen al aumento de tamaño en la superficie y las interiores a un aumento de volumen, aunque a menudo hay integración de las dos capas. La región central, subyacente al carpus, el meristemo medular da lugar a células que se convertirán en la médula, esta región está flanqueada por dos zonas periféricas, que darán origen al procambium, la región cortical y las yemas foliares (Rudall, 2007).

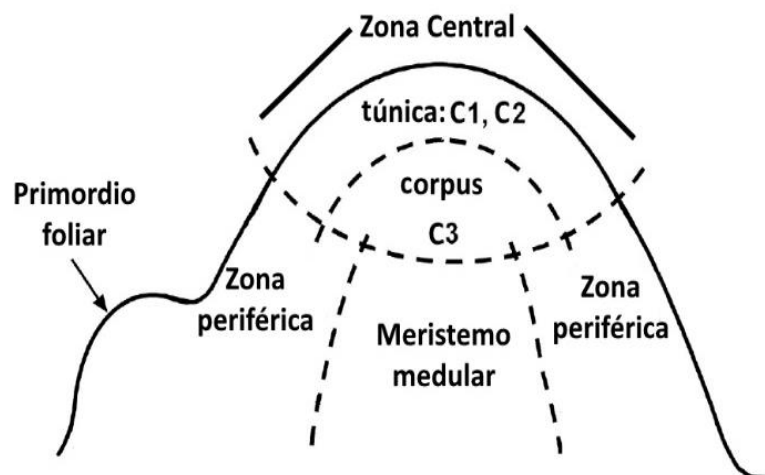


Figura 2. Esquema de la organización túnica-corpus del meristemo en angiospermas. La zona central o ápice. Las capas C1 y C2, que conforman la túnica, la C3 el corpus. Meristemo medular, al centro y las zonas periféricas a los lados. (Modificado de Rudall, 2007).

Meristemo de la raíz (subapical)

En contraste con el meristemo apical del brote, el de la raíz produce células, no sólo hacia el eje, sino también fuera de él, pues forma la caliptra. Debido a la presencia de esta cubierta protectora, la parte distal del meristemo apical de la raíz no es terminal sino subterminal (Esau, 1965). Las células parenquimáticas de la cofia producen y segregan glucosaminoglucano, que sirve como lubricante, que facilita el paso de las raíces por el sustrato (Espinosa, 2014). Las células iniciales y sus derivadas inmediatas se distinguen a menudo, bajo el nombre de promeristemo, estas células se dividen con una baja frecuencia, están rodeadas por zonas donde la tasa de división es mayor. El centro quiescente se conforma por un grupo de células poco activas (Rudall, 2007) y se propone que funciona

como un reservorio celular que puede regenerar el tejido, si se llega a producir algún daño (Espinosa, 2014). Al centro quiescente y las células iniciales circundantes se le denomina promeristemo (Figura 3; Beck, 2005).

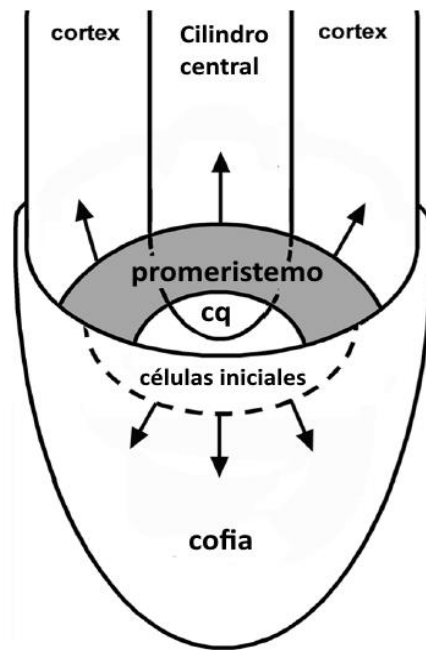


Figura 3. Esquema de la organización del meristemo subapical de la raíz en angiospermas. La cofia cubre al meristemo. Células iniciales. Promeristemo: centro quiescente **cq** y células circundantes. Cilindro central flanqueado por el córtex.

Características de las células meristemáticas

Durante las divisiones activas, las células meristemáticas, carecen de inclusiones ergásticas y los plastos están en forma de proplastidios. Poseen menor cantidad de retículo endoplásmico y la estructura de las mitocondrias es poco compleja. El grado de vacuolización difiere notablemente. Las células meristemáticas de los

meristemos apicales de las angiospermas tienen protoplastos densos. El núcleo es grande en proporción al tamaño de la célula. El tamaño y la forma también son muy variables, en los meristemos apicales son pequeñas y casi isodiamétricas y generalmente poseen paredes celulares delgadas (Esau, 1965).

Meristemos en la familia Podostemaceae

En la mayoría de las angiospermas, los meristemos se establecen en etapas tempranas del desarrollo. El meristemo apical se encuentra en el ápice del brote y el meristemo subapical o de la raíz, se encuentra en el extremo inferior (Esau, 1965). Estos pueden ser establecidos en etapas tempranas del desarrollo del embrión y algunas veces son visibles en semillas maduras. Sin embargo, en algunas especies de la subfamilia Podostemoideae, no es visible el meristemo apical con la morfología túnica-corporis en el embrión.

En Hypericaceae, la familia hermana de Podostemaceae, las plantas consisten de un brote con hojas aéreas y un sistema radicular subterráneo, que constituyen el eje vertical (Kita y Kato, 2005). En contraste, las podostemáceas adquieren un plan corporal horizontal, en las plántulas de la mayoría de las especies no hay formación de una raíz principal, por lo que se forma una raíz adventicia directamente del hipocótilo que actúa como órgano principal, donde surgen los brotes vegetativos y reproductivos (Suzuki *et al.*, 2002). Estudios previos en el estudio de la morfología de las plántulas, sugieren que la reducción de ambos

meristemas juega un papel crucial en la transición de un eje vertical a un cuerpo horizontal en las podostemáceas (Katayama *et al.*, 2011).

Estudios en el desarrollo de plántulas de las tres subfamilias sugieren que la aborción del crecimiento vertical en Podostemaceae podría estar relacionado con la pérdida o reducción de los meristemas embrionarios: apical y subapical (Suzuki *et al.*, 2002; Kita y Kato, 2005; Koi y Kato, 2007; Katayama *et al.*, 2011; Uniyal y Tandon, 2017).

Koi y Kato (2005) proponen un posible escenario de la evolución de la morfología de las plántulas en la familia Podostemaceae, ilustrada por Katayama *et al.* (2011) que compara los patrones de desarrollo en los embriones de la familia con los patrones de desarrollo de las plántulas y se describen a continuación:

Las plántulas de *Ternopsis*, el género basalmente divergente de la subfamilia Tristichoideae (Kita y Kato, 2001), tiene un brote primario corto, con un meristemo apical embrionario entre los cotiledones y un meristemo embrionario de la raíz, en la punta inferior del hipocótilo (Kita y Kato, 2005). Mientras que el meristemo radicular se perdió en el ancestro común de *Weddellinoideae* y *Podostemoideae*; sin embargo, *Weddellina squamulosa* tiene un brote primario con un meristemo apical del brote, pero no tienen una raíz primaria (Koi y Kato, 2007). En el caso de las Podostemoideae, la actividad del meristemo apical del brote se encuentra reducida y adquieren un nuevo mecanismo de desarrollo. Para esta subfamilia se describen dos patrones: en el desarrollo del embrión de *Zeylaniddium lichenoides* se observan las células precursoras del Centro Organizador (CO) del meristemo, pero no se forma un meristemo túnica – corpus (Katayama *et al.*, 2011), en su lugar, surgen una o varias hojas por lo que se le llama un meristemo críptico

(Katayama *et al.*, 2013). En contraste, con especies del género *Hydrobryum*, en el desarrollo del embrión, las células precursoras no se dividen por lo que tampoco se forma un meristemo túnica – corpus, a diferencia del patrón anterior, en estas plántulas no desarrollan hojas, por lo que se supone que han perdido por completo la actividad meristemática del tallo (Katayama *et al.*, 2011, Figura 4;)

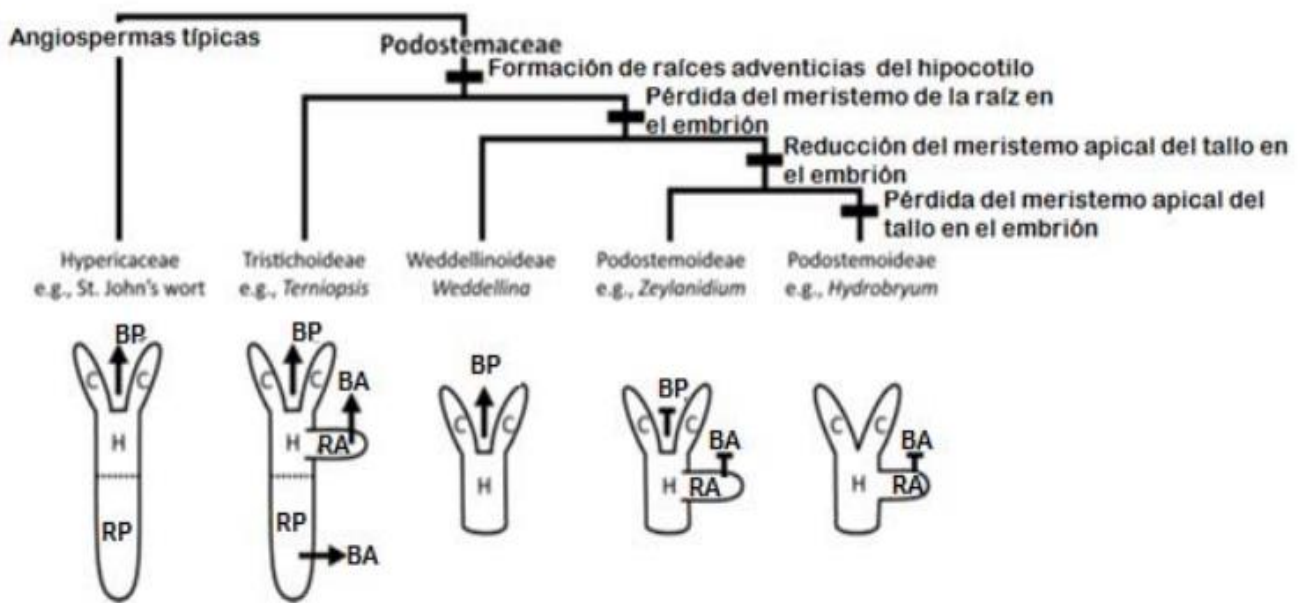


Figura 4. Esquema que ilustra la reducción de los meristemos en la familia Podostemaceae. El esquema muestra a la familia Hypericaceae como el grupo de angiospermas típica con relación a algunos géneros representativos de las tres subfamilias. *Tristichoideae*: *Ternopsis*. *Weddellinoideae*: *Weddellina*. *Podostemoideae*: *Zeylanidium* e *Hydrobryum*. **BP**: brote primario, **C**: cotiledón, **H**: hipocótilo **RP**: raíz primaria, **RA**: raíz adventicia y **BA**: brote adventicio **H**: hipocótilo (Modificado de Katayama *et al.*, 2011).

Por lo tanto en la planta, las raíces se originan a partir de una raíz secundaria de origen endógeno o exógeno, dependiendo de cada especie, o directamente del

hipocótilo en etapas más tardías en la germinación. Esta capacidad es común en la subfamilia Podostemoideae.

Expresión génica en los meristemas de podostemáceas

Katayama *et al.* (2010), analizaron la expresión de los genes ortólogos involucrados en la identidad de los meristemas: *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) y *WUSCHEL* (*WUS*) y *ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEATH2/PAHANTASTICA* (*ARP*), que promueven la identidad de las hojas en angiospermas. En los brotes adventicios de *Ternopsis minor* (Tristichoideae), los ortólogos de *STM* y *WUS* se expresan en el meristemo. En *Hidrobryum japonicum* y *Cladopus doianus* *STM* y *WUS* se expresan en el primordio inicial, pero desaparece cuando comienza la expresión de *ARP* en la parte distal de la hoja. A este patrón en el meristemo, se le denominó meristemo simpodial del brote/tallo, que da lugar a una cadena de hojas con identidad tallo-hoja, éstas se forman repetitivamente por la proliferación de los meristemas simpodiales en la parte adaxial de los preexistentes.

Katayama *et al.* (2013), estudiaron la anatomía y analizaron la expresión en *Zeylanidium lichenoides*, usando el ortólogo de *STM*: *ZISTM* durante la embriogénesis y el desarrollo temprano de las plántulas. La actividad de *ZISTM* se detectó desde la etapa embrionaria de 16 células, desde este momento quedó restringido en la región intercotiledonaria; a estas células se les denominó: meristemo críptico, ya que no tiene la organización celular típica de las

angiospermas. Posteriormente, durante el desarrollo de la plántula, la actividad de *ZISTM* cambió en la base de los cotiledones, en la parte adaxial, en la zona de formación de las hojas plumulares. Al parecer, el desarrollo de las hojas consume al meristemo embrionario. Las dos primeras hojas surgen una adyacente de la otra, pero a partir de la tercera hoja, ésta se forma en la base de la segunda hoja más joven, este patrón de desarrollo es similar al de las hojas de brotes adventicios en otras especies de Podostemoideae.

Estas observaciones demostraron que la identidad del meristemo es parcialmente retenida en el ápice del embrión. El meristemo embrionario críptico tiene un centro organizador, pero no presenta las capas celulares típicas y no se mantiene durante el desarrollo primario del brote.

Vanroyenella

Vanroyenella es un género endémico de México, el cual contiene a una sola especie *Vanroyenella plumosa* Novelo y C. T. Philbrick (Novelo y Philbrick, 1993, 1995). Se encuentra en el límite norte de la distribución de la familia en el continente americano y probablemente está relacionado con *Marathrum*. A pesar del parecido de *Vanroyenella* con especies americanas del género *Marathrum*, existen varias características morfológicas distintivas, que hacen pensar que son géneros totalmente diferentes. Recientemente, mediante análisis moleculares, se propuso que *Vanroyenella plumosa* fuera incorporada al género *Marathrum* como *M. plumosum*. También se propuso la fusión de *M. rubrum* Novelo et C.T. Philbrick

y *M. schiedeana* Cham. en una sola especie *M. foeniculaceum* Bonpl. (Tippery *et al.*, 2011).

V. plumosa crece sumergida en las corrientes rápidas de los ríos, adheridas a rocas graníticas. Se encuentra en zonas muy soleadas del río, creciendo junto con especies del género *Marathrum*; la floración se inicia al final de la estación lluviosa (fines de noviembre) y se extiende hasta fines de marzo (Novelo y Philbrick, 1993). El número de semillas por fruto es de 550-650 en promedio y necesitan de varias semanas para completar su desarrollo dentro de la cápsula (Novelo y Philbrick, 1995). Las semillas, al salir de los frutos, se desplazan sobre el agua y germinan sobre sustratos sólidos, generalmente rocas. Presentan una cubierta seminal que, al contacto con el agua, produce un mucílago que le permite adherirse a los sustratos, no contienen endospermo y presentan dos cotiledones en forma de lanza (puzón). La plúmula consta de algunas hojas; no existe raíz, pero sí un polo radicular cubierto de pelos adhesivos. Después de la ruptura de la cubierta seminal, el hipocótilo crece y se va inclinando al sustrato, se aplanan y se adhieren firmemente, las hojas y flores surgen de este tallo en forma de disco (tallo taloide) (Rutishauser *et al.*, 1999).

En el cuerpo vegetativo se pueden distinguir la raíz y el tallo taloide, que se encuentra dorsiventralmente aplanado. Del tallo emergen las hojas nuevas de cavidades que se encuentran en la base de las hojas jóvenes, pero en la etapa reproductora, éstas son ocupadas por fascículos florales en desarrollo (Murguía *et al.*, 2001).

Descripción taxonómica

Vanroyenella plumosa

Son hierbas con tallo globoso, de hasta 8 mm de diámetro. Poseen hojas en grupos de 1-5, y de 4-12 cm de largo, 0.8-1 cm de ancho; la base del pecíolo es hasta 3 veces más ancha que el pecíolo, el pecíolo de 1-3 cm de largo y hasta 2 mm de diámetro; las hojas pueden presentar el ápice agudo o redondeado; la lámina es ensiforme, plumosa, con divisiones dísticas, distribuidas a lo largo del raquis, de hasta 6 mm de largo y 0.1 mm de ancho, enteras o 1-3 -divididas. Los pedúnculos son más largos en las primeras flores que emergen (3 mm). Los pedicelos de las primeras flores son de hasta 3 cm y los de las flores que emergen después de 1.2 cm; la espatela es de 5-10 mm de largo. Los tépalos de 1.8-2.2 mm de largo. Anteras de 1-1.5 mm de longitud, filamentos 3.5 -5 mm de largo, persistentes y endurecidos hasta la formación del fruto. Estilos de 0.6-1.3 mm de largo. Fruto 3.5–4.2 mm de largo y 1.2-1.7 mm de diámetro. Semillas de 0.25-0.27 mm de largo. Polen 15-20 μm en diámetro, tricolpado, con téctum espinuloso. Cada fascículo está conformado de 4–0 flores que surgen en secuencia que lo hace parecer una pirámide escaliforme. Las flores son hermafroditas, zigomólicas y envueltas en una espatela clavada. La flor tiene 3 tépalos libres, con ápice subulado o bifurcado, dos estambres libres y alternos con los tépalos, confinados a un lado de la flor y un gineceo cuyo ovario prominente presenta dos estructuras apicales (Novelo y Philbrick, 1993) (Figura 5).

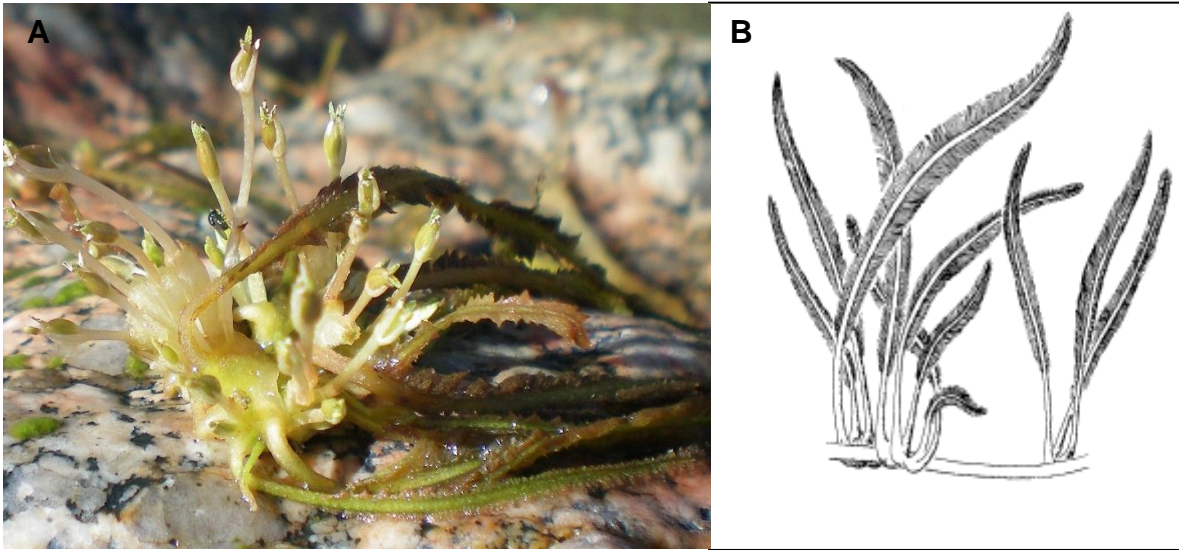


Figura 5. *Vanroyenella plumosa* **A)** flores y hojas “plumosas”. **B)** Esquema que muestra las hojas con ápice agudo y divisiones filamentosas características de la especie (Tomado de Novelo y Philbrick, 1993).

Justificación

Las modificaciones que han desarrollado las plantas de la familia Podostemaceae para el ambiente acuático son de interés biológico y evolutivo. Una de estas modificaciones, es la pérdida o reducción del meristemo apical del tallo y subapical de la raíz, reportado para miembros asiáticos de la subfamilia Podostemoideae. Estudiar el desarrollo en el embrión de la semilla y las primeras etapas del desarrollo de la plántula, podría llevar a un mejor entendimiento de la morfología y evolución de los meristemos y sus adaptaciones en la familia Podostemaceae.

Hipótesis

Sí en especies de la subfamilia Podostemoideae hay patrones de pérdida de meristemas apical del tallo y subapical de la raíz, se espera que en *Vanroyenella plumosa*, una especie americana de la misma subfamilia presente patrones de pérdida de meristemas similares a los descritos para especies asiáticas y australianas

Objetivo general

Determinar la presencia y posición de los meristemas en las etapas de germinación y el desarrollo temprano de la plántula de *Vanroyenella plumosa* (Podostemaceae).

Objetivos particulares

1. Describir las etapas de germinación de la semilla y el desarrollo temprano de las plántulas de *V. plumosa*.
2. Describir las características morfoanatómicas de los meristemas y/o células meristemáticas de cada una de las etapas de desarrollo de la germinación y plántulas de *V. plumosa*.
3. Analizar los resultados en *V. plumosa*, y correlacionarlos con alguno de los modelos propuestos para las especies asiáticas de Podostemoideae y para *Marathrum rubrum*.

Metodología

Los frutos maduros utilizados se colectaron en el Río Horcones, municipio de Cabo Corrientes (20°27'12.1" N, 105°17' 23.9" O; 371 msnm), en el estado de Jalisco, México, en enero de 2015 y 2016.

Las semillas fueron extraídas y puestas a germinar sobre servilletas Kleenex Duramax, dentro de cajas Petri e hidratadas con agua Bonafont. Las cajas se colocaron en una cámara de germinación Thermo Scientific Precision, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad a 25°C ± 1°C, con una intensidad luminosa promedio de 24.90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se dio seguimiento a la germinación, desde la imbibición hasta la aparición de los cotiledones y las primeras hojas verdaderas, que fue de un mes aproximadamente. Las etapas utilizadas para este estudio, basadas en la morfología de la semilla y la plántula se registraron con fotografías al microscopio estereoscópico (LEICA DM500) y fotónico (LEICA E24HD). Las etapas son: semilla hidratada (**sh**), emergencia del polo radicular (**pr**) elongación de cotiledones (**ec**), primordio de hoja 1 (**ph1**), primordio de hoja 2 (**ph2**), los ejemplares de cada una de las etapas se fijaron en FAA (ANEXO I). Se deshidrataron con alcohol etílico, gradualmente (30%, 50%, 70%, 85% y 96% durante 30 minutos y 2 cambios con alcohol etílico al 100% de una hora). Se desecaron a punto crítico con CO₂ y se cubrieron con oro para su observación en un **Microscopio Electrónico de Barrido** JEOL jsm-5310LV 80kv.

Para la observación de cortes en **Microscopía fotónica**, se fijaron las etapas en FAA y se deshidrataron gradualmente en alcohol etílico (descrito anteriormente) y

se incluyeron en mezclas de LR White/alcohol etílico al 25:75, 50:50, 75:25 por una hora, y el LR White al 100 por 3 días completos. Se realizaron cortes semifinos, de 0.25 μm de grosor, con navajas de vidrio, en un micrótopo RMC MT-990 y se tiñeron con azul de toluidina 0.5% para su observación.

También se procesaron muestras para la obtención de fotomicrografías en el **Microscopio Electrónico de Trasmisión (MET)**.

Se fijaron las etapas **ec** y de **ph1** en glutaraldehído-paraformaldehído (ANEXO I) haciendo dos cambios cada 24 h, posteriormente se hicieron 3 lavados con amortiguador de fosfatos 1X (PBS) cada 30 min. Después las muestras se deshidrataron en una serie etanólica gradual (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%) haciendo dos cada 15 minutos en cada concentración. Posteriormente se cambiaron a óxido de propileno por 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se infiltraron gradualmente en mezclas de óxido de propileno – Epon (2:1, 1:1, 1:2) por 24 h en cada una y una de resina pura por 48 h. Para la inclusión, se colocó la resina en cápsulas de gelatina y se acomodó el material vegetal. La polimerización se llevó a cabo a 60°C. Una vez que se obtuvieron los bloques, se talló una pirámide en cada uno y se cortaron en un ultramicrotopo Leica EMUC6 obteniendo cortes ultrafinos de 50-60 μm . Los cortes se montaron en rejillas de cobre cubiertas con formvar. Se contrastaron con Acetato de uranilo (ANEXO I) por 20 minutos y se hicieron lavados por goteo con agua destilada por aproximadamente 1 minuto. Posteriormente se contrastó con Citrato de plomo (ANEXO I) durante 10 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar las rejillas en una caja Petri con papel filtro. Los cortes se observaron en un

microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 y las fotomicrografías se capturaron con una cámara MTI CCD-300-RC.

Resultados

Morfología

La germinación comienza con la imbibición de las semillas y termina con la emergencia de la radícula a través de la cubierta seminal. En las semillas embebidas de *V. plumosa*, el mucílago es poco evidente, pero persiste hasta que se cae la cubierta seminal por el crecimiento de los cotiledones. A las 24 h, se observa un ligero aumento en el tamaño de la semilla (Figura 6 A-D).

La ruptura de la cubierta seminal, a causa de la emergencia del polo radicular, se observa de 2-3 **días después de la imbibición (dpi)** (Figura 6 E y F). En los siguientes días, los cotiledones y el hipocótilo crecen, y emergen pelos adhesivos unicelulares del polo radicular. La cubierta seminal puede o no permanecer adherida a los cotiledones, mientras se desarrollan (Figura 7 A y B). Entre los 11-13 dpi se comienza a observar el surgimiento del primordio de hoja 1 entre los cotiledones (Figura 7 C y D). La aparición del segundo primordio de hoja se observó a partir de los 15 dpi (Figura 7 E y F). Después de 20-30 dpi, las plántulas van degenerando hasta su muerte. Todo esto sucede en las condiciones del cultivo en las cajas de Petri y en las cámaras de germinación.

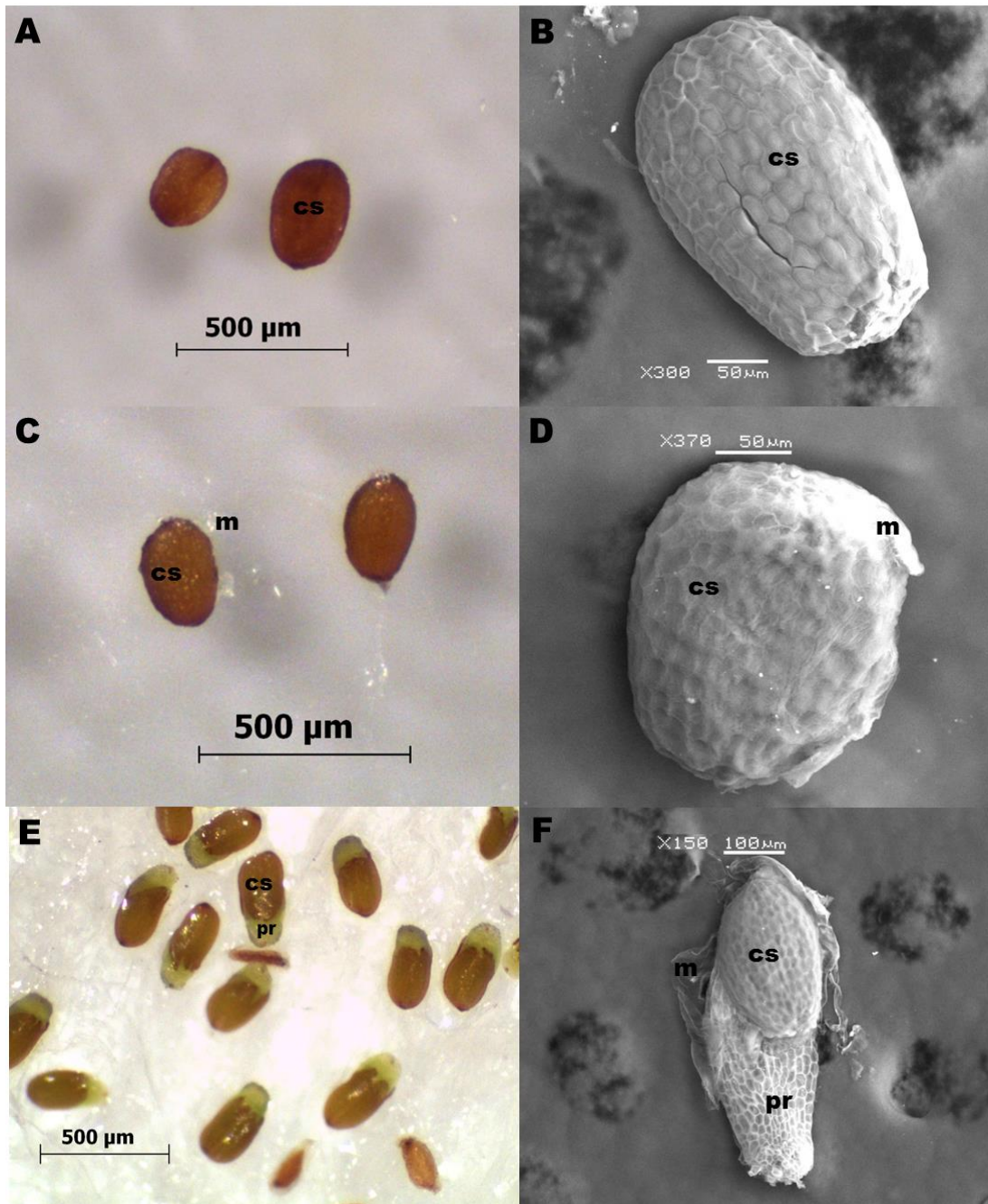


Figura 6. Etapas del desarrollo vegetativo de *Vanroyenella plumosa*. **A, C, E**, vistas al microscopio estereoscópico y **B, D, F**, vistas en microscopía electrónica de barrido. **A y B:** Semilla deshidratada. **C y D:** semilla hidratada con mucílago alrededor (24 h). **E y F:** Emergencia del polo radicular (2-3 dpi). **c:** cotiledón, **cs:** cubierta seminal, **h:** hipocótilo, **m:** mucílago,, **pa:** pelos adhesivos **pr:** polo radicular.

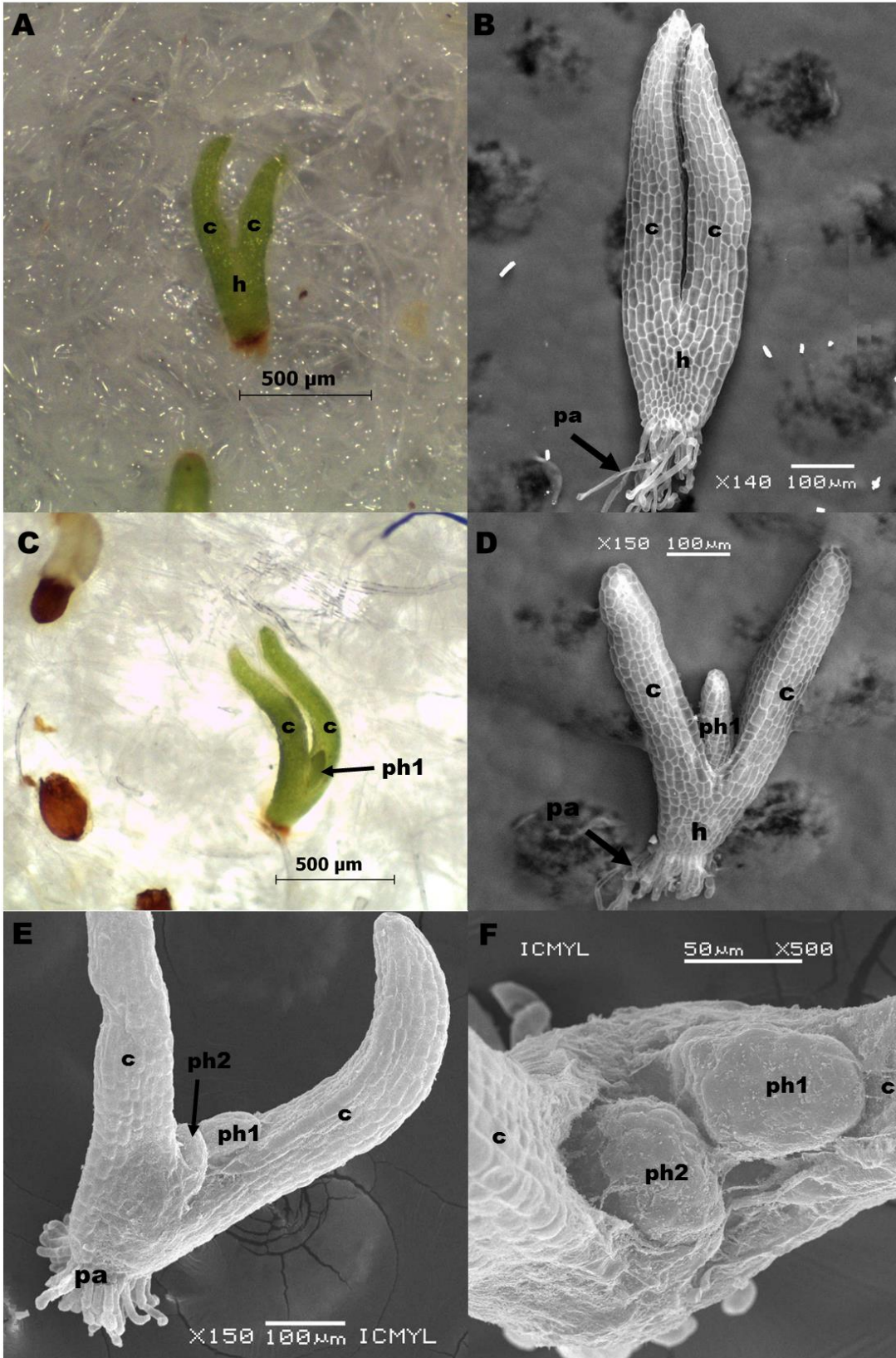


Figura 7. Etapas del desarrollo vegetativo de *Vanroyenella plumosa*. **A, C y E** vistas al microscopio estereoscópico y **B, D y F**, vistas en microscopía electrónica de barrido. **A y B:** elongación de los cotiledones (7 **dpi**). **C y D:** Primer primordio de hoja (11-13 **dpi**). **F y G:** plántula con dos primordios de hoja (15 **dpi**) **c:** cotiledón, **h:** hipocótilo, **ph1:** primordio de hoja 1, **ph2:** primordio de hoja 2 **pa:** pelos adhesivos **pr:** polo radicular.

Anatomía

Semilla hidratada: se observa que el embrión maduro, en el interior de la cubierta seminal, está compuesto por dos cotiledones, un hipocótilo corto y no se observan estructuras meristemáticas típicas (Figura 8 A). En lugar de la estructura meristemática apical, se distingue un grupo de células morfológicamente distintas al resto, entre los cotiledones, éstas son más pequeñas que las células circundantes y con citoplasma denso, por lo que se notan más teñidas (Figura 8 B). Se pueden distinguir, también, células epidérmicas, rodeando al embrión y células parenquimáticas, con gran contenido de almidón, formando a los cotiledones e hipocótilo. Las células de la cubierta seminal segregan mucílago, que es visible a simple vista.

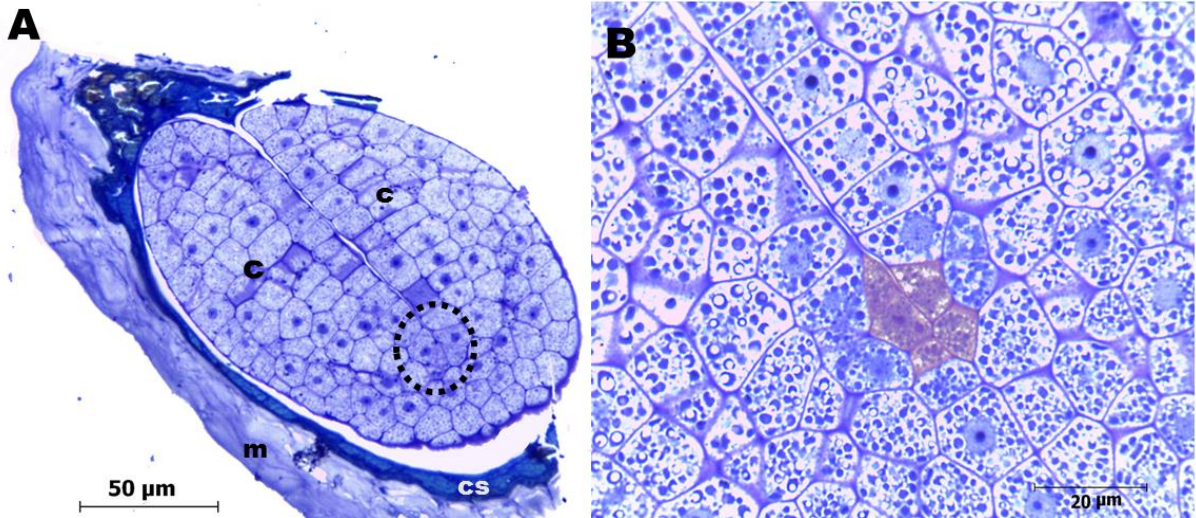


Figura 8. Corte longitudinal de semilla hidratada. **A.** Semilla hidratada con mucilago, rodeando la cubierta seminal. El embrión se observan los cotiledones y un hipocótilo corto pero no se observan meristemos obvios. **B.** Acercamiento de la zona media entre los cotiledones donde se observa un grupo células pequeñas con el citoplasma más denso (coloreadas en naranja). **c:** cotiledón **cs:** cubierta seminal **h:** hipocótilo **m:** mucílago

Emergencia del polo radicular: la ruptura de la cubierta seminal es ocasionada por el crecimiento del embrión y la emergencia del polo radicular. No hay una estructura meristemática túnica-corpúsculo evidente entre los cotiledones. El hipocótilo es corto y está compuesto por células epidérmicas y tejido parenquimatoso. Los cotiledones se encuentran prensados en la cubierta seminal que está rodeada por mucilago (Figura 9 A). En el polo radicular no se observa el meristemo de la raíz; sin embargo, las células epidérmicas comienzan a diferenciarse en pelos adhesivos, con contenido celular denso (Figura 9 B).

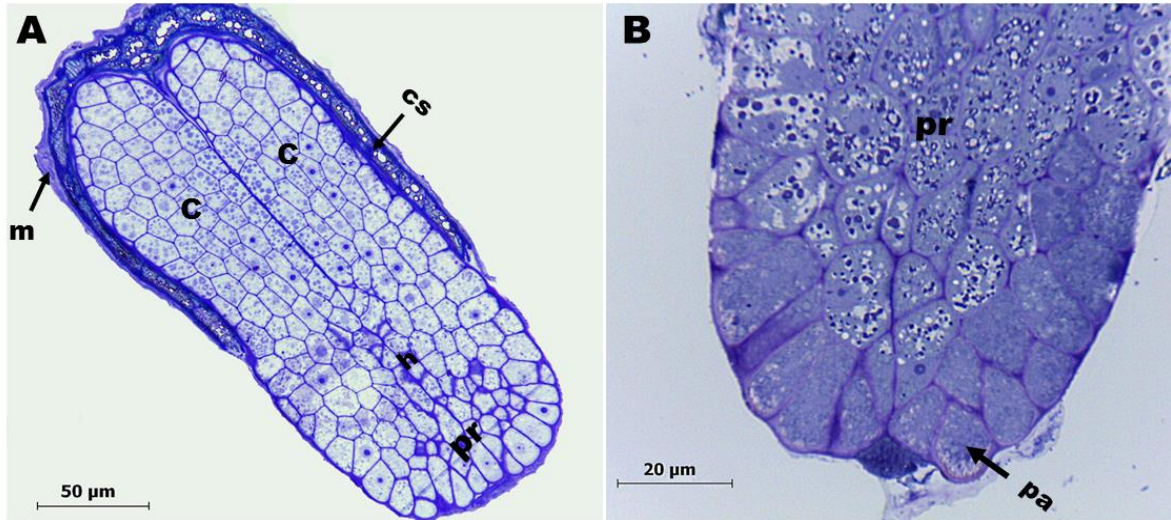


Figura 9. Emergencia del polo radicular. **A.** El crecimiento del embrión ocasiona la ruptura de la testa. El mucílago en la cubierta seminal es persistente, los cotiledones están apesados por la cubierta seminal. **B.** Las células de la epidermis se diferencian en pelos adhesivos (señalado con la flecha). **c:** cotiledón **cs:** cubierta seminal **h:** hipocótilo **m:** mucílago **pa:** pelos adhesivos **pr:** polo radicular

Elongación de cotiledones: la diferenciación de los tejidos se hace más evidente a medida que el brote se desarrolla, el hipocótilo y los cotiledones se alargan, la epidermis se observa bien diferenciada y el parénquima con gran cantidad de granos de almidón. Las células pequeñas que ocupan el área del meristemo apical del brote, entre los cotiledones presentan contenido citoplasmático denso (Figura 8 A y B). Algunas células de la epidermis del polo radicular se elongan para formar pelos adhesivos unicelulares, su citoplasma denso puede atribuirse a la producción de mucílago (Figura 8 C).

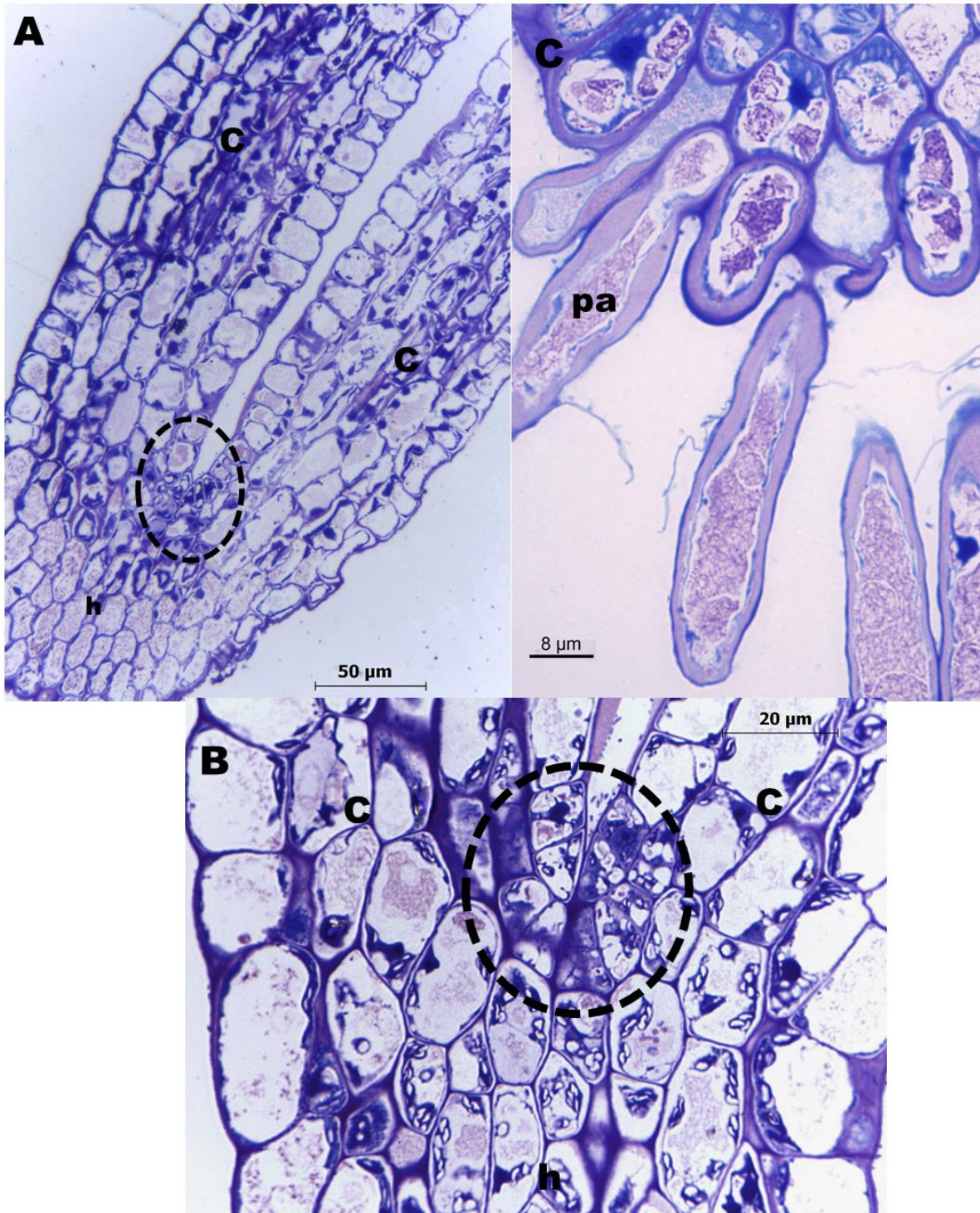


Figura 10. Tres secciones de una plántula de 8 dpi en etapa de elongación de cotiledones. **A.** Células pequeñas entre los cotiledones **B.** Grupo de células densamente teñidas en la unión de los cotiledones **C.** pelos adhesivos unicelulares formados por la elongación de las células epidérmicas del polo radicular secretores de mucílago **c:** cotiledón **h:** hipocótilo **pa:** pelos adhesivos

Hojas: La plántula sigue creciendo debido a la división y alargamiento de las células hipocotiledonarias y cotiledonarias. El primordio de hoja 1 surge del grupo de células entre los dos cotiledones (figura 11 A), las células que componen el primordio son pequeñas, tienen un citoplasma denso, por lo que observan más teñidas (Figura 11 B). A medida que el primordio va creciendo las células se observan menos densas pero son de menor tamaño que las circundantes (Figura 11 C-D).

El primordio de hoja 2, se desarrolla adyacente al primero (Figura 11 E). Las células que componen los primordios son más pequeñas que las células del primordio de hoja 1, su citoplasma es denso y no presentan granos de almidón (Figura F).

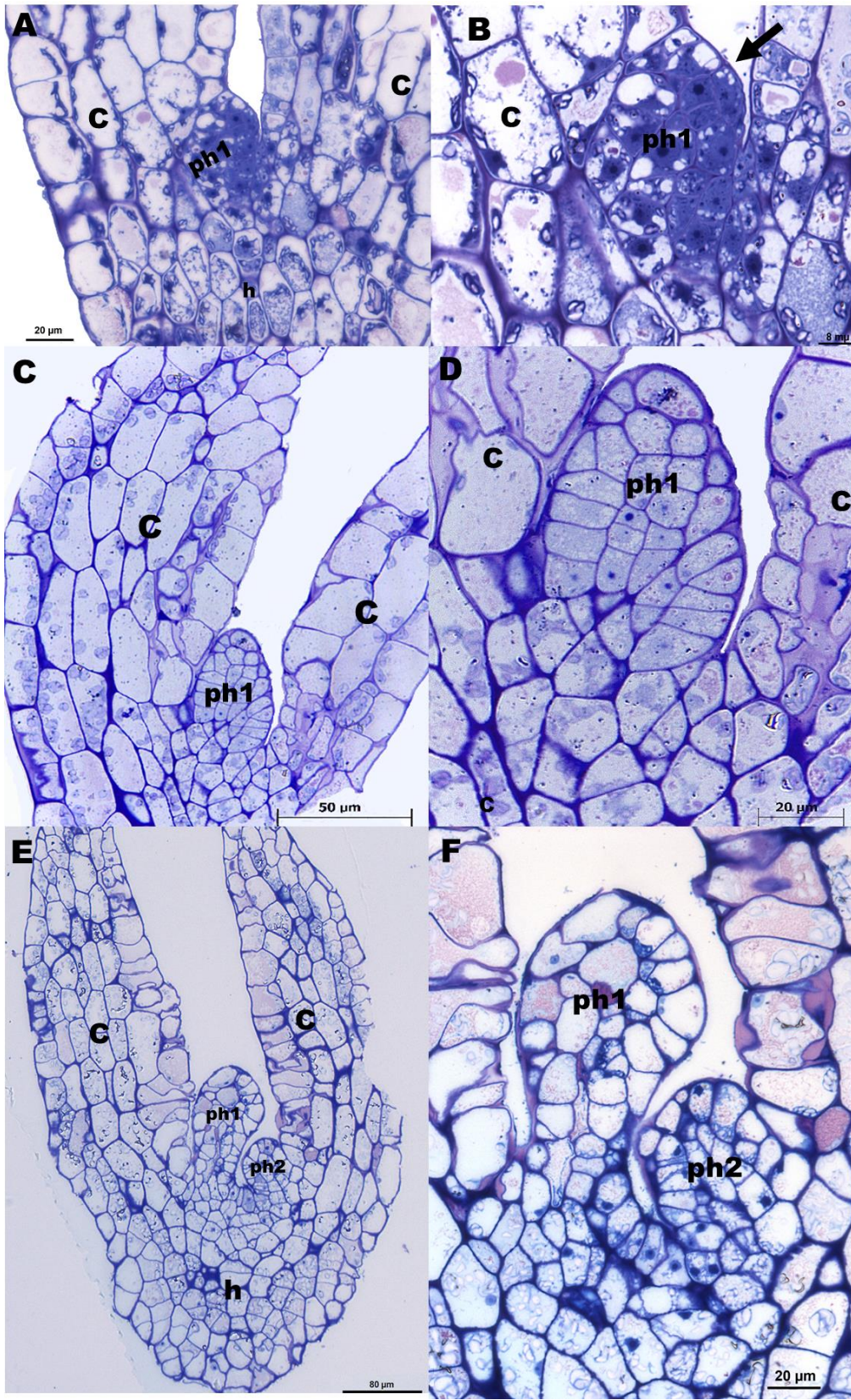


Figura 11. Porción media de la plántula, que muestra las células que darán origen a los primordios de hojas. **A- B.** Células que dan origen al primordio de hoja 1 **C- D.** Plántula con el primordio ya formado **E.** Plántula con dos primordios de hoja **F.** Células que componen los dos primordios de hojas.
c: cotiledón **h:** hipocótilo **ph1:** primordio de hoja 1 **ph2:** primordio de hoja 2.

Ultraestructura

Las características de las células a nivel ultraestructural, que se encuentra en la base de los cotiledones, apuntan a que pueden tener la función de un meristemo apical. Estas células tienen paredes celulares primarias delgadas, gran cantidad de ribosomas, retículo endoplásmico, núcleos grandes en comparación con el tamaño de las células, así como una estructura que probablemente corresponda al dictiosoma (Figura 12 A). La cromatina del núcleo está en la fase de heterocromatina y el nucléolo es conspicuo (Figura B). Otros organelos corresponden a vacuolas muy pequeñas y también se aprecian escasas inclusiones de almidón (Figura 12 C).

Las células de las hojas presentan diferencias notables con las células de la base de los cotiledones. En tamaño, las células de la base de los cotiledones son de menos tamaño que las circundantes. En las células de las hojas se observan muchas vacuolas, cloroplastos con almidón, y el núcleo así como el nucléolo están bien definidos (Figura 12 D-E). También las células del hipocótilo son diferentes ya que presentan en su citoplasma grandes cantidades de almidón (Figura 12 F).

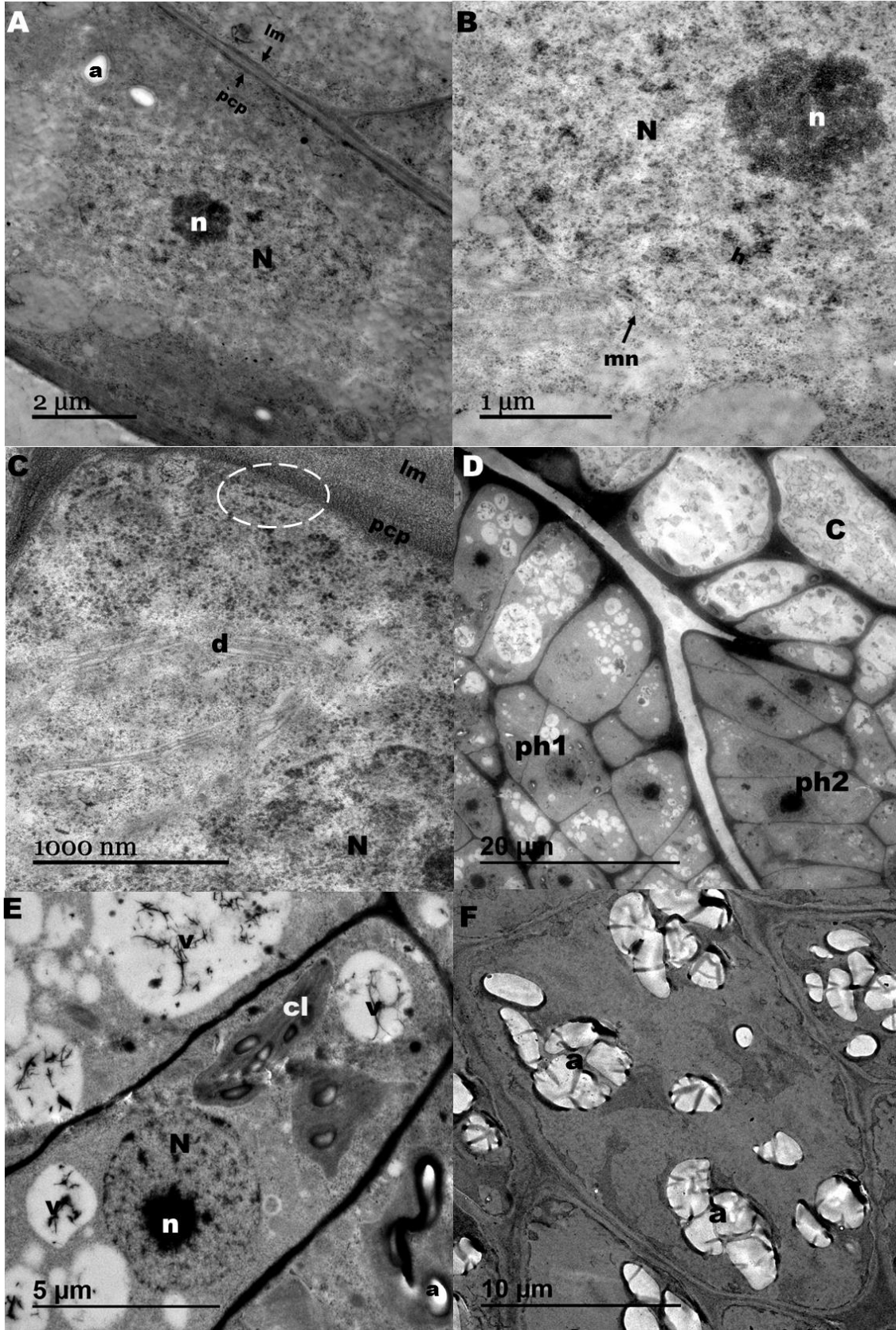


Figura 12. Ultraestructura de las células de una plántula de *V. plumosa* a los 7dpi **A-C.** y células de una plántula de 11-13 dpi **C-F** . **A.** Célula perteneciente al grupo que da origen al primordio de hoja 1. **B.** Acercamiento del núcleo de la célula **A.**

C. Pared celular primaria delgada (pcp), lámina media (lm) y adosado a la membrana plasmática, un grupo de ribosomas (círculo). **D.** Porción de la plántula con dos primordios de hoja y parte del cotiledón **E.** Célula del primordio de hoja 1 **F.** Células del hipocótilo con granos de almidón.

a: almidón **c:** cotiledón **cl:** cloroplasto **d:** dictiosoma **lm:** lámina media **mn:** membrana nuclear **N:** núcleo **n:** nucléolo **pcp:** pared celular primaria **ph1:**

Discusión

En este estudio se observó que el patrón de desarrollo *in vitro* de *Vanroyenella plumosa* es semejante a las especies asiáticas-australianas, de la subfamilia Podostemoideae y difieren ligeramente del patrón mostrado para la especie americana *Marathrum rubrum* (Uniyal y Tandon, 2017; Susuki *et al.* 2002; Sehgal *et al.* 2007; Sehgal *et al.* 2002; Katayama *et al.* 2013).

En general, las semillas se hinchan al contacto con el agua o medio líquido y secretan mucílago que es el primer mecanismo de fijación al sustrato. Posteriormente la cubierta seminal se rompe por el crecimiento del polo radicular, en especies como *Polypleurum stylosum* esto sucede a las 7dpi, en *Hydrobryopsis sessilis* ocurre de 4-6 dpi, en *Griffithella hookeriana* hasta los 15 dpi, en *Vanroyenella plumosa* sucede de 2-3 dpi. El polo radicular se expande y se desarrollan numerosos pelos adhesivos debido a la elongación de las células epidérmicas. Se ha reportado que estos pelos secretan algún tipo de sustancia pegajosa que les impide desprenderse del medio de cultivo con facilidad (Sehgal

et al. 2002; Uniyal y Tandon, 2017). En *V. plumosa*, los pelos adhesivos se adherían fuertemente al sustrato y en los cortes se observa algún tipo de secreción pero no se hicieron pruebas para determinar su composición química. En cortes *M. rubrum* también se observa la secreción aunque no se menciona. Los cotiledones e hipocótilo se alargan y a los días siguientes se observa la actividad de las células entre los cotiledones, en *P. stylosum* se observaron un par de hojas a los 14-15 dpi, en *Zeylanidium lichenoides* surge un primordio de hoja a los 11 dpi al igual que en *V. plumosa* y en *H. sessilis* se observa el primer primordio a los 12 dpi. Subsecuentemente las hojas surgen de forma alterna, en *M. rubrum* se observaron 4 hojas a los 17 dpi, en *H. sessilis* 4 hojas (Figura 13 A) en 25 dpi. Al mismo tiempo que sucede la aparición de las hojas, en el hipocótilo se observa actividad meristemática debido a la formación de una raíz adventicia, en las especies americanas *V. plumosa* y *M. rubrum* no se observó, mientras que en *Z. lichenoides* se observó a la par del surgimiento del primordio de hoja (11 dpi) y *P. stylosum* se observó a los 22-23 dpi (Uniyal y Tandon, 2017; Susuki *et al.* 2002; Sehgal *et al.* 2007; Sehgal *et al.* 2002). Esto pudo ser porque el tiempo que se produce la raíz adventicia es mucho más tardío con respecto al surgimiento de las primeras hojas del brote o por las condiciones de la germinación en las especies americanas. El estudio del desarrollo *in vitro* de la plántulas aporta información acerca de la morfología de la plantas ya que las condiciones en su hábitat son bastante extremas. Aunque existen diferencias entre la germinación *in vitro* y su crecimiento natural en los ríos, principalmente en el grado de desarrollo de los órganos. Moham Ram y Sehgal (1997), reportan que el número de hojas presentes puede ser influenciado por las concentraciones del medio de cultivo. En

este estudio se utilizó papel humedecido con agua, baja en sales, sin adicionar nada más para la germinación de las semillas.

Katayama *et al.* (2013) acuña el termino meristemo crítico para nombrar a las células que dan origen a las hojas entre los cotiledones en *Z. lichenoides*, usando el gen ortólogo de *STM*, que juega un papel crucial en la promoción de la división celular en los meristemas apicales del brote en eudicotiledóneas. Está reportado que después de que el meristemo crítico forma algunas hojas, éste cesa su actividad, por lo que se le considera un **meristemo determinado** (Susuki *et al.* 2002; Katayama *et al.* 2013; Sehgal *et al.* 2002, 2007).

En cuanto al meristemo de la raíz, se ha observado en el desarrollo del embrión de algunas Podostemoideae, que las células hijas de la hipófisis que van a dar origen al meristemo subapical de la raíz, no se dividen por lo que no se desarrolla una estructura meristemática (Katayama *et al.* 2011) por lo que en el desarrollo de la plántula no hay una raíz primaria y en su lugar se forman pelos adhesivos por la prolongación de las células epidérmicas del polo radicular (Suzuki *et al.*, 2012, Katayama *et al.*, 2013; Sehgal *et al.*, 2007,2002; Uniyal y Tandon, 2017).

De acuerdo con la propuesta de Katayama *et al.* (2011), existen dos patrones de desarrollo del dominio apical del embrión para la subfamilia Podostemoideae:

1. basado en el desarrollo de *Zeylanidium lichenoides*, en el cual se presenta un meristemo crítico que carece de la capa celular L1, y puede formar solo algunas hojas, por lo que se considera un meristemo determinado y no se forma un meristemo subapical de la raíz. En contraste con lo observado, 2. en *Hidrobryum japonicum*, donde no existe un meristemo apical ni la formación de hojas y

tampoco se desarrolla un meristemo subapical de la raíz, por lo que el cuerpo de la planta se desarrolla de una raíz adventicia.

V. plumosa se acopla al primer modelo ya que se observa el desarrollo del brote primario en ausencia de un meristemo apical evidente, con la estructura túnica-carpus, pero se forman dos hojas provenientes de un grupo de células entre los cotiledones (Figura 13 B). Estas células parecen corresponder al **meristemo críptico**, observado en *Z. lichenoides*, ya que su posición y sus características histológicas son similares. Este patrón difiere con lo reportado para *M. rubrum*, donde la primera hoja surge en medio de los cotiledones (Figura 13 C; Martínez, 2015), aunque se menciona que las hojas que surgen posteriormente tienen la misma filotaxia que en *Z. lichenoides* (Figura 13 D). Se ha observado que el patrón de surgimiento de las hojas entre los cotiledones (cuerpo primario) es similar a la formación de las hojas de los brotes adventicios (cuerpo adulto), donde surge un nuevo primordio foliar en el lado adaxial de la segunda hoja más joven, como los brotes advencios de *Cladopus queenslandica* y *Zeylanidium sunulatum* (Imaichi *et al.*, 2005; Koi *et al.*, 2005). Este puede ser un patrón general de los meristemos de la subfamilia Podostemoideae (Katayama, 2011; Martínez, 2015).

Este estudio aporta información acerca de la morfología de otra especie americana. Estas etapas tempranas en el desarrollo son cruciales para el establecimiento en los ríos, aunque puede haber diferencias al desarrollo en la naturaleza, nos da una idea del proceso.

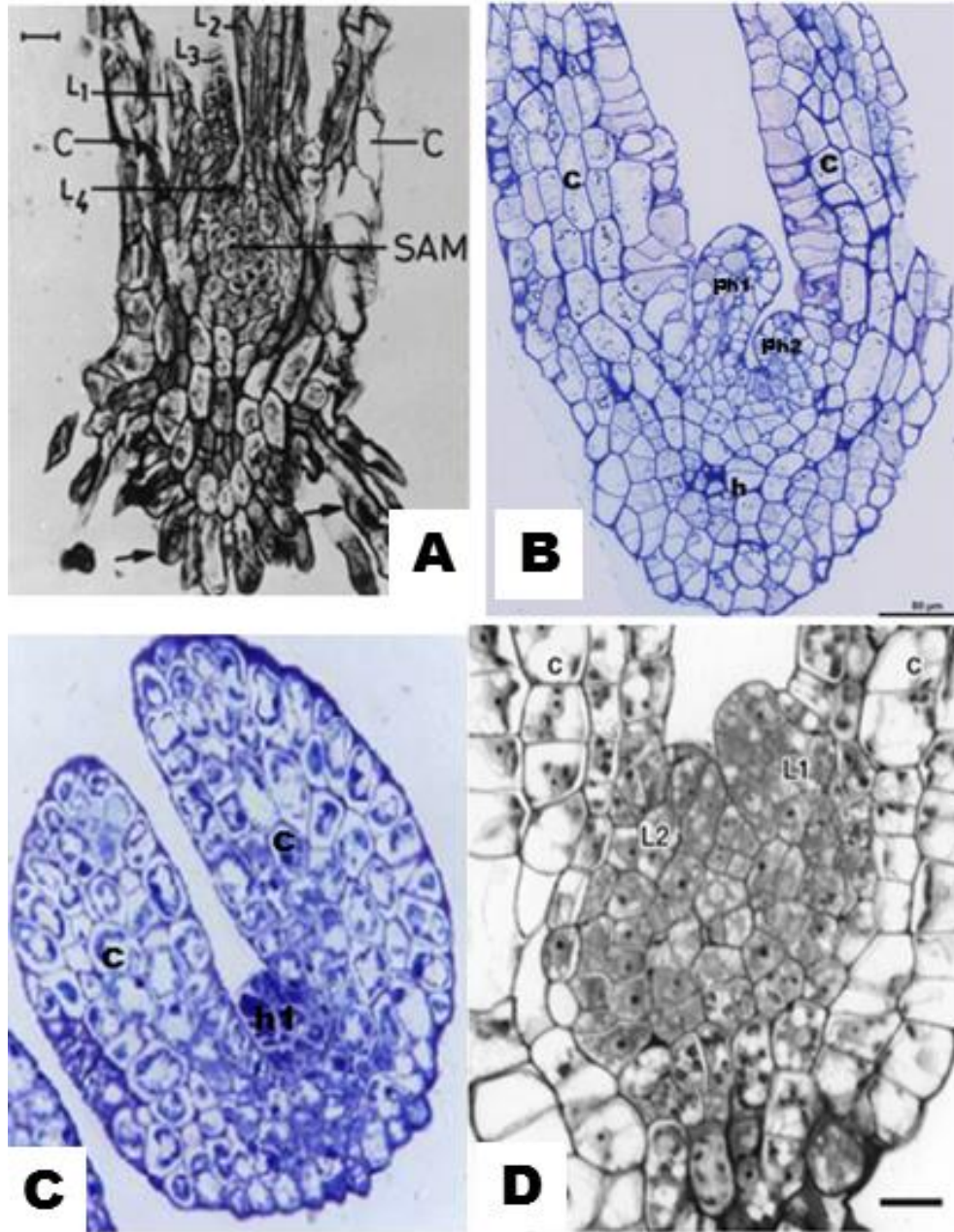


Figura 13. Patrones de surgimiento de las hojas en cuatro especies de Podostemoideae. **A.** *Hydrobryopsis sessilis* con cuatro hojas alternas entre los cotiledones (Sehgal *et al.*, 2002). **B.** *Vanroyenella plumosa* con dos hojas entre los cotiledones, que surgen de forma alterna dística, como en *Z. lichenoides* y *H. sessilis*. **C.** *Marathrum rubrum* una hoja entre los cotiledones (Martínez, 2015) **D.** *Zeylanidium lichenoides* dos hojas que surgen en la base de cada cotiledón, que surgen de forma alterna dística (Katayama *et al.*, 2013)
L1: hoja 1, **L2:** hoja 2, **L3:** hoja 3, **L4:** hoja 4, **SAM:** Meristemo apical del brote
c: cotiledón **ph1:** primordio de hoja 1 **ph2:** primordio de hoja 2 **h1:** hoja 1
h: hipocótilo

Conclusiones

El patrón de desarrollo de las plántulas de *V.plumosa* *Z. lichenoides* donde el desarrollo se lleva a cabo en ausencia de un meristemo apical con la estructura túnica corpus, y en su lugar presenta un meristemo críptico que se supone es determinado.

El desarrollo de las hojas es similar que en *Z. lichenoides*, donde las hojas se desarrollan alternadamente.

No existe un meristemo subapical de la raíz evidente, por lo que la fijación al sustrato se lleva a cabo mediante pelos adhesivos.

Perspectivas

En este trabajo, las células existentes en el ápice del hipocótilo entre los cotiledones se distinguen por su ultraestructura; sin embargo, es claro que se deben aplicar otras técnicas para asegurar que son células meristemáticas y que son las responsables de la formación de las hojas definitivas, presentes después de la germinación.

El seguimiento del desarrollo del embrión nos permitiría observar célula por célula qué pasa con las células que van a dar origen a los meristemas.

La hibridación *in situ* con genes que participan en el establecimiento de los meristemas como *SHOOT MERISTEMLESS* (STM), *WUSCHEL* (WUS) y *ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEATH2/PAHANTASTICA* (ARP) ayudaría encontrar las células que tienen esta actividad.

Bibliografía

1. Beck C. B. 2005. An introduction to Plant Structure and Development: plant anatomy for the 21st century. Cambridge press. pp 431.
2. Cook, C. D. K. y R. Rutishauser. 2007. Podostemaceae. Pp. 304 – 344 en: The families and genera of vascular plants vol. 9, ed. K. Kubitzki. Berlin: Springer Verlag.
3. Esau K. 1965. Plant anatomy. 2nd. Edn. Wiley New York.
4. Espinosa M. S. 2014. Histología y Anatomía Vegetal En: Valencia A. S (Ed). Introducción a las embriofitas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.p:37-60.
5. Gustafsson M. H., V. Bittrich. y P. F. Stevens. 2002. Phylogeny of Clusiaceae Base don *rbcL* sequences. *International Journal of Plant Science* 163(6):1045-1054.
6. Imaichi R., Y. Hiyama. y M. Kato. 2005. Leaf Development in the Absence of a Shoot Apical Meristem in *Zeylanidium subulatum* (Podostemaceae). *Annals of Botany*. 96: 51-58.
7. Jäger-Zun I. y M. Grubert 2000. Podostemaceae depend on sticky biophilms with respect to attachment to rocks in waterfalls. *International Journal of Plant Sciences* 161: 599-607.
8. Katayama N., M. Kato. y T. Yamada. 2013. Origin and development of the cryptic shoot meristem in *Zeylanidium lichenoides* (Podostemaceae). *American Journal of Botany*. 100(4): 635-646.
9. Katayama N., M. Kato., T. Nishiuchi. y T. Yamada. 2011. Comparative anatomy of embryogenesis in three species of Podostemaceae and evolution of the loss of embryonic shoot and root meristems. *Evolution and development* 13(4): 333-342.

10. Katayama N., S. Koi y M. Kato. 2010. Expression of SHOOT MERISREMLESS WUNSCHEL and ASYMMETRIC LEAVES1 homologs in the shoots of Podostemaceae: implications for the evolution of novel shoot organogenesis. *The Plant Cell* 22(7): 2131-2140.
11. Kato M. 2016. Multidisciplinary studies of the diversity and evolution in river-weeds. *Journal of Plant Reserch* 192(3): 397-410.
12. Kita Y. y M. Kato. 2001. Intrafamilial Phylogeny of the Aquatic Angiosperm Podostemaceae inferred from the Nucleotide Sequences of the *matk* Gene. *Plant Biology* 3:156-163.
13. Kita Y. y M. Kato. 2005. Seedling developmental anatomy of an undescribed *Malacotristicha* species (Podostemaceae, subfamily Tristichoideae) with implications for body plant evolution. *Plant Systematics and Evolution* 254:221-232.
14. Koi S. y M. Kato. 2007. Developmental Morphology of the Shoot in *Weddellina squamulosa* and Implications for Shoot Evolution in the Podostemaceae. *Annals of Botany* 99:1121-1130.
15. Koi S. y N. Katayama. Gene Expression Analysis of Aquatic Angiosperms Podostemaceae to Gain Insight into the Evolution of Their Enigmatic Morphology. En: De Smet I. (ed.) 2013. Plant organogenesis: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology. Vol 956. Springer Science + Bussines Media. New York.
16. Koi S., R. Imaichi. y M. Kato. 2005. Endogenous Leaf Initiation in the Apical-Meristemless Shoot of *Cladopus queenslandicus* (Podostemaceae) and Implications form Evolution of Shoot Morphology. *International Journal of Plant Sciencie*. 166(2):199-206.
17. Koi, S., Y. Kita, Y. Hirayama, R. Rutishauser, K. A .Huber, y M. Kato. 2012. Molecular phylogenetic analisys of Podostemaceae:

- implications for taxonomy of major groups. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 461-492.
18. Martínez B. V. I. 2015. Estructura de los meristemos de *Maratrum rubrum* (Podostemaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México
 19. Moham Ram H. Y. y A. Shegal. 1997. In vitro studies on the developmental morphology of the Indian Podostemaceae. *Aquatic Botany*. 57:97-132.
 20. Murguía S. G., A. Novelo R., T.C. Philbrick., G. J. G. Márquez., 2001. Desarrollo de los verticilos sexuales de *Vanroyenella plumosa* Novelo & Philbrick (Podostemaceae). *Acta Botánica Mexicana* (57): 37-50.
 21. Novelo R. A. y C. T. Philbrick. 1993. Vanroyenella: A New Genus of Podostemaceae from Jalisco, México. *Systematic Botany* 18(1): 64-67.
 22. Philbrick C. T. y A. Novelo R. 1998. Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Maratrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 62:199-206.
 23. Philbrick C. T. y A. Novelo R. 1995. New World Podostemaceae: Ecological and Evolutionary enigmas. *Brittonia* 47(2): 210-222.
 24. Philbrick T.C. 1984. Aspects of floral biology, Breeding System, and Seed and Seedling Biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Systematic Botany* 9(2):166-174.
 25. Rudall J.P. 2007. Anatomy of Flowering Plants. An introduction to Structure and Development. Cambridge University Press. pp 137.
 26. Ruhfel B. R., V. Bittrich., C. P Bove., M H. G. Gustafsson C. T. Philbrick., R. Rutishauser., Z., Xi., y C. C. Davis. 2011. Phylogeny of

- the Clusoid Clase (Malpighiales): Evidence from the Plastid and Mitochondrial Genomes. *American Journal of Botany* 98(2):306-325.
27. Rutishauser R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (riverweeds). *Aquatic Botany* 57(1-4): 29-70.
28. Rutishauser R., R. A. Novelo y T. C. Philbrick. 1999. Developmental Morphology of New World Podostemaceae: *Marathrum* and *Vanroyenella*. *International Journal of Plant Sciences* 160 (1):29-45.
29. Savolainen V., M. F. Fay., D. C. Albach., A. Backlund, M. van der Bank., K. M. Cameron., S. A. Johnson., M. D., Lledó., J.-C. Pintaud, M. Powell., M. C. Sheahan., D. E. Soltis., P. S. Soltis., P. Weston., M. Whitten., K. J. Wurdack. y M. w. Chase. 2000. Phylogeny of Eudicots: A Nearly Complete Familial Analysis Based on *rbcL* Gene Sequences. *Kew Bulletin* 55:257-309.
30. Sehgal A, M. Sethi y H. Y, Moham Ram. 2002. Origin, structure and interpretation of the thallus in *Hydrobryopsis sessilis* (Podostemaceae). *International Journal of Plant Science* 163(6):891-905.
31. Soltis D. E., P. S. Soltis., P. S., M. W. Chase, M. E. Mort., D. C. Albach., M. Zanis., V. Salvolainen., W. H. Hahn., S. B. Hoot., M. F. Fay., M. Axtell., S. M. Swensen., L. M. Prince., W. J. Kress., K. C. Nixon y J. S. Farris. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL* y *atpB* sequences. *Botanical Journal of Linnean Society* 133:381-461.
32. Sussex I. M. y N. M. Kerk .The organization and function of plant meristems en (Eds.) McManus y B. E. Veit. 2002. Meristematic tissues in Plant and Development.
33. Sussex I. y N. M. Kerk. 2001. The evolution of plant architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 4(1): 33-37.

34. Suzuki K., Y. Kita. y M. Kato. 2002. Comparative Developmental Anatomy of Seedlings in Nine Species of Podostemaceae (Subfamily Podostemoideae). *Annals of Botany* 89:755-765.
35. Tippery N.P., T. C. Philbrick., C.P Bove., y D. H. Les. 2011. Systematics and Phylogeny of Neotropical Riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany* 36(1): 105-118.
36. Uniyal P. y R. Tandon. 2017. Studies on the Morphology and In Vitro Seed Germination of *Polypleurum stylosum* var. *lanciniata* (Podostemaceae). *Proceedings of the National Academy of Science, India Seccion B: Biological Science*. 87(4): 1177-11183.
37. Van Royen P .1951. The Podostemaceae of the New World. Part I. *Meded Bot. Mus. Herb. Utrecht*, 107: 1-150, 16 plates.
38. Zlotnik A. y M. Ponce. 2013 b. La raíz. En: Márquez J., M Collazo, M Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds). *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.p28-29.
39. Zlotnik A. y M. Ponce. 2013. Tejidos vegetales. En: Márquez J, M Collazo, M Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds). *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.p: 22-27.

ANEXO I. Reactivos

FAA (Formaldehído-ácido acético- alcohol- agua)

- Formaldehído 100 ml
- Alcohol etílico 96% 500 ml
- Ácido acético glacial 50 ml
- Agua destilada 350ml

Glutaraldehído-Paraformladehído

- Glurataldehído 6%
- Paraformaldehído al 4%
- Amortiguador de fosfato (PBS)

Contrastantes para microscopía electrónica de transmisión

Citrato de plomo (Venable) para 10 ml de solución

- Agua hervida asilada de CO₂ atmosférico (10 ml)
- Citrato de plomo (0.035 mg)
- NaOH (0.01 ml)

En un vaso de o cristizador poner agua a hervir, tapar el recipiente para evitar el contacto con el CO₂ atmosférico. Tapar y dejar enfriar. Al agua se le agrega 0.1 ml de NaOH y después se le añade el 0.035 mg de citrato de plomo.

Se recomienda almacenar en alícuotas a 4°C. Antes de utilizarse se centrifuga durante 10 minutos a 1500rpm para precipitar cualquier impureza.

Acetato de Uranilo 4% para 10 ml de solución

- Agua bidestilada (10 ml)
- Acetato de Uranilo (400 mg)

Agregar el acetato de uranilo en el agua destilada y agitar en una parrilla magnética. La solución tiene una coloración amarilla. Se recomienda almacenar en alícuotas en 4°C y cubrir los tubos con papel aluminio, ya que se precipita con la luz. Antes de utilizar centrifugar durante 10 minutos a 1500rpm para precipitar cualquier impureza.