



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

ULTRAESTRUCTURA DEL PLASMODIO NUCELAR
(PSEUDOSACO EMBRIONARIO) DE *NOVELOA COULTERIANA*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Ulises Ricardo Villanueva Arciniega

Tutora principal de tesis: **Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán**
Facultad de Ciencias. UNAM
Comité Tutor: **Dra. María de Lourdes Segura Valdez**
Facultad de Ciencias. UNAM
Dr. Juan Nuñez Farfán
Instituto de Ecología. UNAM

CD. MX.

ABRIL 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

ULTRAESTRUCTURA DEL PLASMODIO NUCELAR
(PSEUDOSACO EMBRIONARIO) DE *NOVELOA COULTERIANA*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Ulises Ricardo Villanueva Arciniega

Tutora principal de tesis: **Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán**
Facultad de Ciencias. UNAM
Comité Tutor: **Dra. María de Lourdes Segura Valdez**
Facultad de Ciencias. UNAM
Dr. Juan Nuñez Farfán
Instituto de Ecología. UNAM

MÉXICO, CD. MX.

ABRIL 2018



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/367/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de marzo de 2018 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** del (la) alumno(a) **VILLANUEVA ARCINIEGA ULISES RICARDO** con número de cuenta **303289023** con la tesis titulada "**Ultraestructura del plasmodio nuclear (pseudosaco embrionario) de *Noveloa coulteriana***", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN**:

Presidente: DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA
Vocal: DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO
Secretario: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
Suplente: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de abril de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/ipp

Agradecimientos institucionales:

Quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, por haberme brindado la oportunidad de crecer profesional y personalmente a través de la Maestría.

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología CONACYT. Por los apoyos económicos recibidos para poder realizar el presente estudios (beca) y al proyecto PAPIME.

A los miembros de mi Comité Tutor:

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dr. Juan Núñez Farfán y a la Dra. María de Lourdes Segura Valdez, por sus valiosos comentarios durante el desarrollo del presente proyecto.

A mi tutora: Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, por todo el apoyo obtenido durante el desarrollo de esta tesis.

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado una vez más la oportunidad de crecer y ser.

A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, por dirigir este proyecto con su experiencia y por su paciencia que siempre es mucha.

A los integrantes del Jurado: Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia, Dra. Martha Juana Martínez Gordillo, Dr. Juan Servando Núñez Farfán, Dra. Sonia Vázquez Santana y Dra. María De Lourdes Segura Valdez, por la mejora de este documento a través de sus correcciones.

A la Dra. Reyna Lara Martínez, por las numerosas horas de amable atención, en la observación en el microscopio electrónico, así como en la toma de electrón-micrografías

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco, por la ayuda recibida en campo, y en el laboratorio, asesoría en las técnicas histológicas

A la M. en F.P. Ana Isabel Bieler Antolín, por su ayuda en la toma de microfotografías en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Agradecimientos Personales

A mi madre Elia Arciniega Martínez, por todo el apoyo, paciencia y amor.

Índice

Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Antecedentes.....	14
Objetivo.....	18
Materiales y métodos.....	21
Resultados.....	24
Discusión.....	35
Conclusiones.....	38
Literatura citada.....	39

Resumen

La familia Podostemaceae es de entre las angiospermas acuáticas, la más numerosa. Habita en cascadas o ríos de corrientes rápidas, su ciclo de vida está ligado a la estacionalidad de dichos cuerpos de agua. Las especies de Podostemaceae poseen características embriológicas únicas, una de ellas es la ausencia de la doble fecundación y, por lo tanto, la ausencia de endospermo, y la presencia de una estructura llamada plasmodio nucelar. La familia Podostemaceae se encuentra dividida en tres subfamilias: Podostemoideae, la que contienen al mayor número de especies, y a la cual pertenece *Noveloa coulteriana* (Tul.) C.T. Philbrick, Tristichoideae (con seis géneros) y Weddellinoideae (monotípica). *Noveloa coulteriana* es una especie endémica de México, que se localiza particularmente en la vertiente del Pacífico desde Baja California Sur y Sonora hasta Guerrero.

En esta investigación, se llevó a cabo un estudio a nivel estructural y ultraestructural del desarrollo del plasmodio nucelar en *N. coulteriana*, a través de la microscopia de luz y electrónica de transmisión. En el presente trabajo se reporta que las paredes de las células nucleares de *N. coulteriana* no se degradan en el tiempo indicado como ocurre en otros miembros de la subfamilia Podostemoideae. Este proceso se retrasa, ya que las paredes comienzan a presentar signos de degradación, cuando ya existe un embrión de al menos cuatro células, lo cual no coincide con lo reportado para la subfamilia Podostemoideae. Por otra parte, dado que un plasmodio se define como una masa citoplasmática con núcleos morfológicamente bien formados, esta definición no corresponde con lo observado en *N. coulteriana*, ya que el estado de los núcleos que componen a la nucela se encuentran en degradación, desde que el botón floral se encuentra dentro de la espatela.

Abstract

The family Podostemaceae, is among the angiosperms aquatic, the most numerous. It lives in waterfalls or fast-flowing rivers, its life cycle is linked to the seasonality of these bodies of water. The family has unique embryological characteristics, one of them is the absence of double fertilization and, therefore, the absence of endosperm and the presence of a structure called nucellar plasmodium. The Podostemaceae family is divided into three subfamilies: Podostemoideae, which contains the largest number of species, and to which belongs *Noveloa coulteriana*, Tristichoideae and Weddellinoideae (monotypic). *N. coulteriana* is an endemic species of Mexico, which is localized particularly in the Pacific slope from Baja California Sur and Sonora to until Guerrero states.

In this research, the structural and ultrastructural study of the development of the plasmodium nucelar in *N. coulteriana* was carried out through light microscopy and transmission electron microscopy. It is reported in the present work that *Noveloa coulteriana* does not degrade cell walls of nucellar cells at the time indicated for Podostemoideae, to which it belongs. This process begins when there is already an embryo of at least 4 cells, which does not coincide with that reported for the Podostemoideae. On the other hand, given that a plasmodium is defined as a cytoplasmic mass with morphologically well-formed nuclei, this definition does not correspond to that observed in *N. coulteriana*, since the state of the nuclei that make up the nucellus are in degradation since the bud flower is inside the spatella

Introducción

Podostemaceae está incluida en el orden Malpighiales, es la familia de angiospermas estrictamente acuáticas más grande (Rutishauser, 1997), con aproximadamente 270 especies y 48 géneros, ubicados en tres subfamilias; Podostemoideae, que incluye a la mayoría de los géneros, Tristichoideae, con seis géneros (Koi *et al.*, 2012) y Weddellinoideae, monotípica (Tippery *et al.*, 2011). Se encuentran presentes tanto en el viejo como en el nuevo mundo y su distribución es principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Philbrick y Novelo, 1995).

La morfología vegetativa de la familia difiere sustancialmente de las demás angiospermas (Rutishauser, 1997) y adoptan formas postradas y dorsoventralmente aplanadas en el sustrato rocoso, semejando cuerpos talosos y foliosos (O' Neill *et al.*, 1997), que recuerdan la morfología de los musgos y líquenes. Los caracteres embriológicos también son únicos para la familia (Kapil, 1970).

El ciclo de vida de las podostemáceas transcurre ligado a cascadas y ríos con corrientes rápidas, así como a la estacionalidad de los cuerpos de agua, es decir; con temporadas de lluvias y secas. Las plantas se adhieren a un sustrato rocoso mediante un microfilm, componente pegajoso constituido principalmente por sustancias poliméricas extracelulares, producido en asociación con cianobacterias (Jäger-Zürn y Grubert, 2000), el cuerpo vegetativo se encuentra totalmente sumergido durante la temporada de lluvias, pero durante la etapa reproductiva, las flores son expuestas al ambiente aéreo, cuando los niveles de agua son menores, es decir en la temporada de secas (Rutishauser, 1997).

Novelo y Philbrick (1997) cuestionaron la inclusión de las especies de *Oserya* mexicanas (*O. coulteriana* y *O. longifolia*), por las considerables diferencias morfológicas con las especies sudamericanas. Las especies mexicanas tienen anteras dehiscentes, introrsas o latrorsas, uno a tres (*O. coulteriana*) o dos (*O. longifolia*) estambres por flor, y cápsulas con seis costillas sin sutura. En contraste, las especies sudamericanas de *Oserya* presentan anteras con dehiscencia extrorsa, un solo estambre y diez costillas sin sutura. *Oserya* es disyunta geográficamente; su rango norte incluye centro y sur de México, mientras que su distribución al sur es predominantemente en el norte de Sudamérica (el centro de Venezuela, las Guayanas y el norte de Brasil). Los dos clados donde se encuentra *Oserya*, propuestos por Tippery *et al.* (2011) (clados D y E, figura 1), reflejan la disyunción mexicana/sudamericana. La parafilia de estos clados no fue soportada por el análisis de datos combinados (datos moleculares -ITS, rbcL, trnL- y morfológicos), pero ninguno de estos análisis las ubica como monofiléticas.

Debido a las diferencias mencionadas entre los miembros de *Oserya* en México, comparadas con las sudamericanas, se establecieron dos especies de este género para México: *Noveloa coulteriana* y *Noveloa longifolia* (Tippery *et al.*, 2011). *Noveloa* es diferente de su género hermano *Oserya* por la división de sus hojas en forma dicotómica o subdicotómica (pinnada en *Oserya*), tres costillas sin sutura por cápsula (5 en *Oserya*) y de 1 a 3 estambres (flores uniestaminadas en *Oserya*). *Noveloa* es un género escasamente estudiado y el desarrollo del plasmodio nucelar es un proceso que puede aportar información sobre la ubicación taxonómica del grupo.

Antecedentes

Las angiospermas constituyen el grupo más diverso de organismos del reino Plantae, contando con alrededor de 260, 000 a 300, 000 especies, distribuidas en 300 o 400 familias, se encuentran prácticamente en todos los hábitats de la Tierra, desde los trópicos a la tundra, incluyendo ambientes acuáticos (Martínez, 2013).

La doble fecundación, con embrión y endospermo como productos de este evento, es una característica única y exclusiva de las angiospermas, que las define como un grupo monofilético (Williams y Friedman 2002). Es el proceso que consiste en la fusión de un núcleo espermático haploide (gameto masculino), con el núcleo de la ovocélula también haploide (gameto femenino), conocido como singamia, formando un cigoto diploide que se desarrollará en un embrión, y la fusión del otro núcleo espermático, haploide también, con los núcleos polares de la célula central (triple fusión), generando al endospermo, que proveerá de nutrientes al embrión para sostener su desarrollo (Davis, 1966). Este tejido de reserva que se forma como resultado de una doble fecundación, es un evento crucial para la reproducción en dicho grupo, y constituye una sinapomorfia para las plantas con flor.

En las angiospermas, el embrión, el endospermo y la nucela son partes fundamentales de la semilla. En el aporte de nutrientes, la formación apropiada de la semilla se logra a través del desarrollo coordinado de estos componentes, que presentan ploidías diferentes, el endospermo (generalmente $3n$) y los tejidos maternos circundantes; nucela y tegumento(s) ($2n$) (Sreenivasulu y Wobus, 2013). El óvulo es la estructura que contiene al megagametofito femenino o saco embrionario, rodeado por una nucela o megasporangio, rodeado a su vez de uno o dos tegumentos, que dejan un pequeño orificio llamado micrópilo para la entrada del tubo polínico (Yadegary y Drews, 2004).

La nucela se forma a partir de la placenta del óvulo por múltiples divisiones, que conforman un promontorio rodeado por la epidermis: epidermis nucelar. La

epidermis nucelar rodea a las células nucleares, durante las primeras etapas, la célula, situada directamente por debajo de la epidermis nucelar, se diferencia en una célula arquesporrial primaria, que es conspicua, ya que posee un tamaño más grande que el resto, por un contenido citoplasmático más denso y un núcleo prominente. En la mayoría de las angiospermas, la célula arquesporrial se divide periclinalmente para formar la capa parietal primaria y la célula esporógena. La célula esporógena generalmente no experimenta más divisiones mitóticas y funciona como la célula madre de la megaspora. Cuando la epidermis de la nucela es uniestratificada en la zona del micrópilo, y la célula arquesporrial funciona directamente como célula madre de la megaspora y se encuentra en contacto directo con la epidermis de la nucela, recibe el nombre de tenuinucela, por otra parte, cuando la nucela presenta una epidermis pluriestratificada, o bien, si es uniestratificada pero la célula arquesporrial tiene una o varias divisiones periclinales, originando una o varias células parietales, recibe el nombre de crasinucela (Endress, 2011).

A pesar de su estructura básica relativamente estable, los óvulos han logrado una diversidad de formas, y dependiendo de la posición y curvatura. Los óvulos se han clasificado de acuerdo al eje del funículo (tejido que conecta al óvulo con la placenta), la nucela, la cálaza (región donde convergen la nucela y los tegumentos) y el micrópilo, siendo los más comunes: los óvulos anátropos (60% de las angiospermas), y se caracterizan por estar invertidos, con un giro de 180° , fusionándose con la base del funículo, de manera que el micrópilo queda situado cerca del funículo. El óvulo ortótropo (8% de las angiospermas) es recto, con el micrópilo en el ápice y el funículo en el otro extremo. Entre estos dos tipos de óvulos se encuentran varias formas intermedias con distintos grados de curvatura, como son los óvulos campilótropos, hemianátropos, anfítropos, epitropos, pleurótropos, etc (Endress, 2011).

Endospermo

El endospermo tiene su origen en la doble fecundación, como producto de un núcleo espermático que se fusiona con los dos núcleos polares (triple fusión) contenidos en la célula central. El endospermo se produce durante el desarrollo temprano de la semilla, pero no siempre está presente en la semilla madura, ya que es común que gran parte del endospermo, o su totalidad, sea consumido durante el desarrollo del embrión (Raghavan, 2006).

La primera división mitótica del endospermo suele ser anterior a la del cigoto. El endospermo puede presentar tres tipos de desarrollo temprano: 1) Nuclear: durante la primera etapa sólo hay cariocinesis; la citocinesis o formación de paredes ocurre posteriormente, y suele suceder de manera centrípeta y del embrión hacia la cálaza, es el tipo de desarrollo más común entre las angiospermas. 2) Desarrollo del endospermo tipo celular: cada cariocinesis es seguida de una citocinesis. 3) Desarrollo del endospermo tipo Helobial: en este caso primero hay una mitosis desigual, formando dos células: la célula calazal es pequeña y suele no dividirse o dividirse muy poco, mientras que la célula micropilar presenta muchas cariocinesis sin citocinesis, las citocinesis aparecen más tarde (Davis, 1966).

La familia Podostemaceae, pese a sus peculiaridades morfológicas vegetativas, los caracteres distintivos que la definen son embriológicos, tales como: carencia de formación de plúmula y radícula en el embrión maduro, un saco embrionario reducido, compuesto de cuatro células y cuatro núcleos, ausencia de antípodas (Kapil, 1970), y algo único dentro de las angiospermas, que es la ausencia de formación de endospermo, atribuido por varios autores a la ausencia de doble fecundación. Chaudhary *et al.* (2014) demuestra en su artículo más reciente, que en *Zeylanidium lichenoides*, la ausencia de doble fecundación se debe a la degeneración temprana de la célula central del saco embrionario. Otra característica es la degradación de la nucela para formar una estructura que recibe el nombre de plasmodio nucelar, anteriormente llamado pseudo-saco embrionario (Went, 1908; Arekal y Nagendran, 1975a; Jäger-Zürn, 1997).

En las angiospermas, la nucela es un tejido materno del óvulo que aporta nutrientes para el desarrollo del saco embrionario, y si persiste durante el desarrollo, se transforma en perispermo, donde sigue desempeñando un papel en la nutrición del embrión durante la germinación (Jhori *et al.*, 1992). En Podostemaceae la nucela se transforma en plasmodio nucelar, siendo éste, un carácter distintivo de la familia (Davis, 1966). El plasmodio nucelar se forma por la degradación de las paredes células nucleares en el óvulo (Went, 1908). Se piensa así, que el plasmodio nucelar reemplaza la función del endospermo de nutrir al saco embrionario y posteriormente al embrión (Went, 1908; Razi, 1949; Mukkada, 1969; Arekal y Nagendran, 1977; Chaudhary *et al.*, 2014), suposición apoyada por la presencia de múltiples núcleos, pertenecientes al plasmodio en cercanía con el saco embrionario y posteriormente con el embrión (Mukkada, 1969; Arekal y Nagendran, 1977b Jäger-Zürn, 1967, 1997) lo que sugiere una actividad de síntesis (Arekal y Nagendran, 1975).

Noveloa coulteriana pertenece a la subfamilia Podostemoideae, esta subfamilia se caracteriza porque el plasmodio nucelar “comienza a desarrollarse en la etapa de la primera división mitótica de la megaspóra (megasporogénesis), y se completa antes de que el saco embrionario alcance su madurez” (Jäger-Zürn, 1967, 1997). Sin embargo, observaciones anteriores de nuestro grupo de trabajo, ponen en duda el tiempo de formación del plasmodio nucelar con respecto al desarrollo del megagametofito. De esta forma, la presente investigación tiene como propósito estudiar a nivel óptico y electrónico (ultraestructural), el plasmodio nucelar de *Noveloa coulteriana* durante su formación.

Objetivos

General:

Estudiar la ultraestructura del plasmodio nucelar de *Noveloa coultariana* (Podostemaceae), durante su formación.

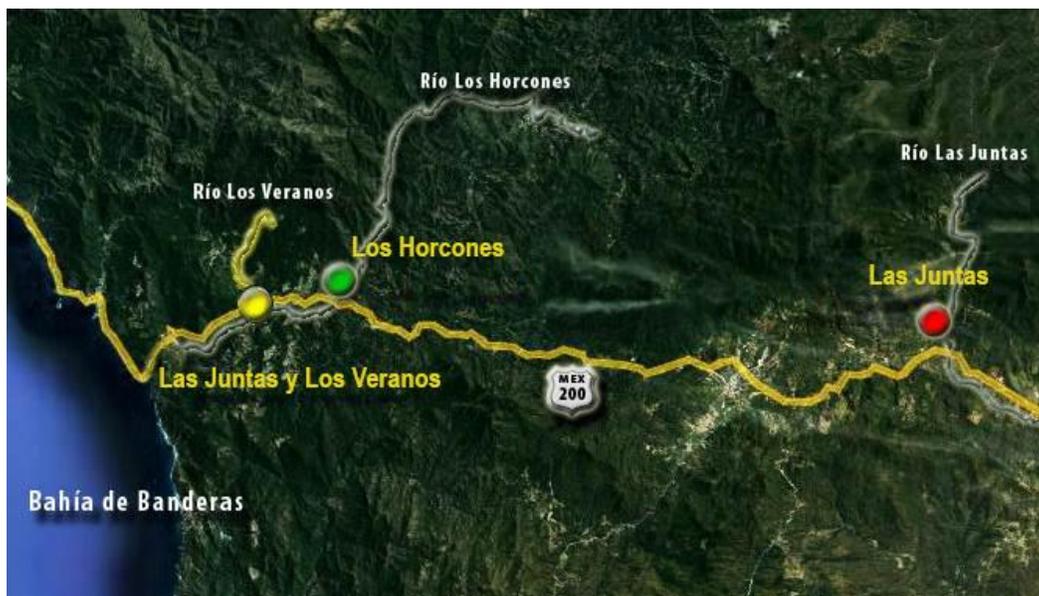
Particulares:

- 1.-Describir la anatomía y la ultraestructura del óvulo con énfasis en la nucela.
- 2.-Describir ma formación del plasmodio nucelar.
- 4.- Determinar si existe integridad nuclear durante el desarrollo del plasmodio nucelar.

Materiales y métodos

- Colecta del material

Se colectaron botones florales y flores de *Noveloa coulteriana*, en enero del 2015, correspondiente a la temporada de secas, que es cuando las plantas exponen sus flores al medio aéreo, ya que el resto del año las plantas permanecen sumergidas completamente. La colecta se realizó en los: Los Horcones, Municipio de Cabos Corrientes, Jalisco ($20^{\circ}27'12.1''N$, $105^{\circ}17'23.9''O$; 371 msnm), Las Juntas del Sur, Municipio de Cabo Corrientes, Jalisco ($20^{\circ}14'43.6''N$, $105^{\circ}18'42.2''O$; 347msnm), y Los Veranos, el cual llega a la localidad conocida como Chico's Paradise, aproximadamente 25 km al sur de Puerto Vallarta ($20^{\circ} 26' 05''N$, $105^{\circ} 18' 10'' O$; 264 msnm) (mapa 1).



Mapa 1. Localidades de los ríos: Horcones (punto verde), Las juntas (punto rojo) y coincidencia entre los ríos Las juntas y Los Veranos (punto amarillo) en donde se colectó *N. coulteriana*.

- Procesamiento del material para su observación al microscopio de luz (ML).

Los botones florales se fijaron por inmersión en una mezcla de glutaraldehído-paraformaldehído (3.5%-1.5%), en buffer de fosfatos PBS (pH 7.2), durante 24 horas, a una temperatura de 4°C, posteriormente las muestras se sometieron a tres lavados en el mismo buffer de fosfatos. La deshidratación se realizó de manera gradual, con etanol (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y dos cambios en 100%), durante una hora cada uno. Una vez deshidratado el material se procedió a la preinclusión o infiltración gradual, primero en óxido de propileno puro, dos cambios de 1 hora y posteriormente con una mezcla de óxido de propileno- Epon (3:1, 2:1, 1:1) por 24 horas, realizando un último cambio en Epon puro (24 horas), finalmente se polimerizaron a 60 °C por 72 horas. Una vez polimerizados, los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo (Leica, modelo ultracut R), obteniendo cortes semifinos (0.70 µm de grosor) teñidos con azul de toluidina.

- Procesamiento del material para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET)

Para la obtención de los cortes ultrafinos, una vez que se seleccionó el área de interés en los bloques en Epon, se obtuvieron cortes histológicos de entre 40 a 60 nanómetros de grosor en un ultramicrotomo (Leica, modelo ultracut R), los cuales se montaron en rejillas de cobre con membrana Formvar, para posteriormente ser contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, durante 30 y 10 minutos,

respectivamente. Finalmente los cortes fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010 a 80 KV).

- El material colectado de *N. coulteriana*, se dividió en tres etapas:

1) Botón floral próximo a la antesis: Debido a que *N. coulteriana* presenta flores prácticamente desnudas, se consideró como etapa botón floral cuando aún se encuentra dentro de la espátela, el estigma cerrado, al igual que las anteras se encuentra pronunciado a través de la espátela (figura 2.1).

2) Flor en antesis: En esta etapa las flores se encuentran fuera de la espátela, las anteras se encuentran dehiscentes, y con presencia de polen, el estigma se aprecia turgente y receptivo, con los lóbulos estigmáticos abiertos (figura 2.2).

3) Flor post-antesis: Las anteras lucen maltratadas sin polen o ausentes, el estigma se observa adelgazado y senescente (figura 2.3).

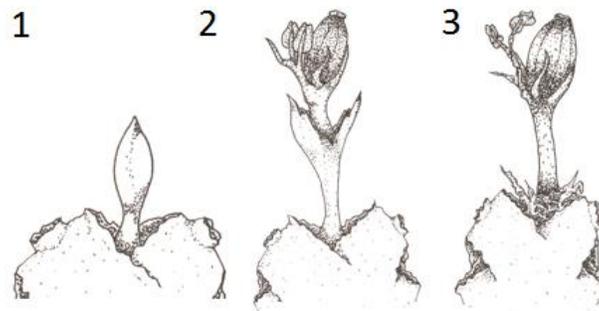


Figura 2. Etapas de desarrollo estudiadas de *N.coulteriana*. 1. Botón próximo a la antesis, 2. Flor en antesis, 3. Flor post-antesis.

- Descripción botánica

Noveloa coulteriana (Tul.) C. Philbrick.

Es una planta perenne o anual bajo condiciones desfavorables, sus raíces de hasta 20 cm de largo y de 0.5 a 1.8 mm de ancho; hojas hasta de 10 cm de largo cuando están sumergidas, más pequeñas o ausentes, cuando quedan expuestas al aire, cerca de la superficie del agua o durante la antesis, de color verde brillante o a veces rojizas, pecíolo comprimido, de 0.5 a 1.5 cm de largo, generalmente armado, a los lados con papilas o dientecillos agudos a redondeados, láminas hasta seis veces divididas, últimas divisiones de 0.1 a 0.3 mm de ancho, ápice agudo; espátela hasta de 6.5 mm de largo; tépalos laterales de 0.7 a 1.6 mm de largo, tépalo del ápice del andropodio de 0.4 a 0.8 mm de largo, andropodio de 0.9 a 1.5 mm de largo, filamentos de 0.4 a 1.4 mm de largo, anteras con dehiscencia introrsa, de 0.4 a 1.1 mm de largo; ovario con dos carpelos iguales, estigmas de 0.2 a 0.7 mm de largo, de ápice agudo; pedicelos en fruto hasta de 1.5 cm de largo, cápsulas elipsoides, de 1.6 a 2.8 mm de largo y 0.8 a 1.2 mm de diámetro, con dos valvas del mismo tamaño, persistentes, de color moreno claro, éstas con tres costillas cada una, las costillas se unen al ápice del pedicelo formando una estructura columnar; semillas elipsoides, ca. 30 por fruto, de 0.22 a 0.28 mm de largo y 0.12 a 0.14 mm de ancho. (Novelo y Philbrick, 2000) (figura 3).

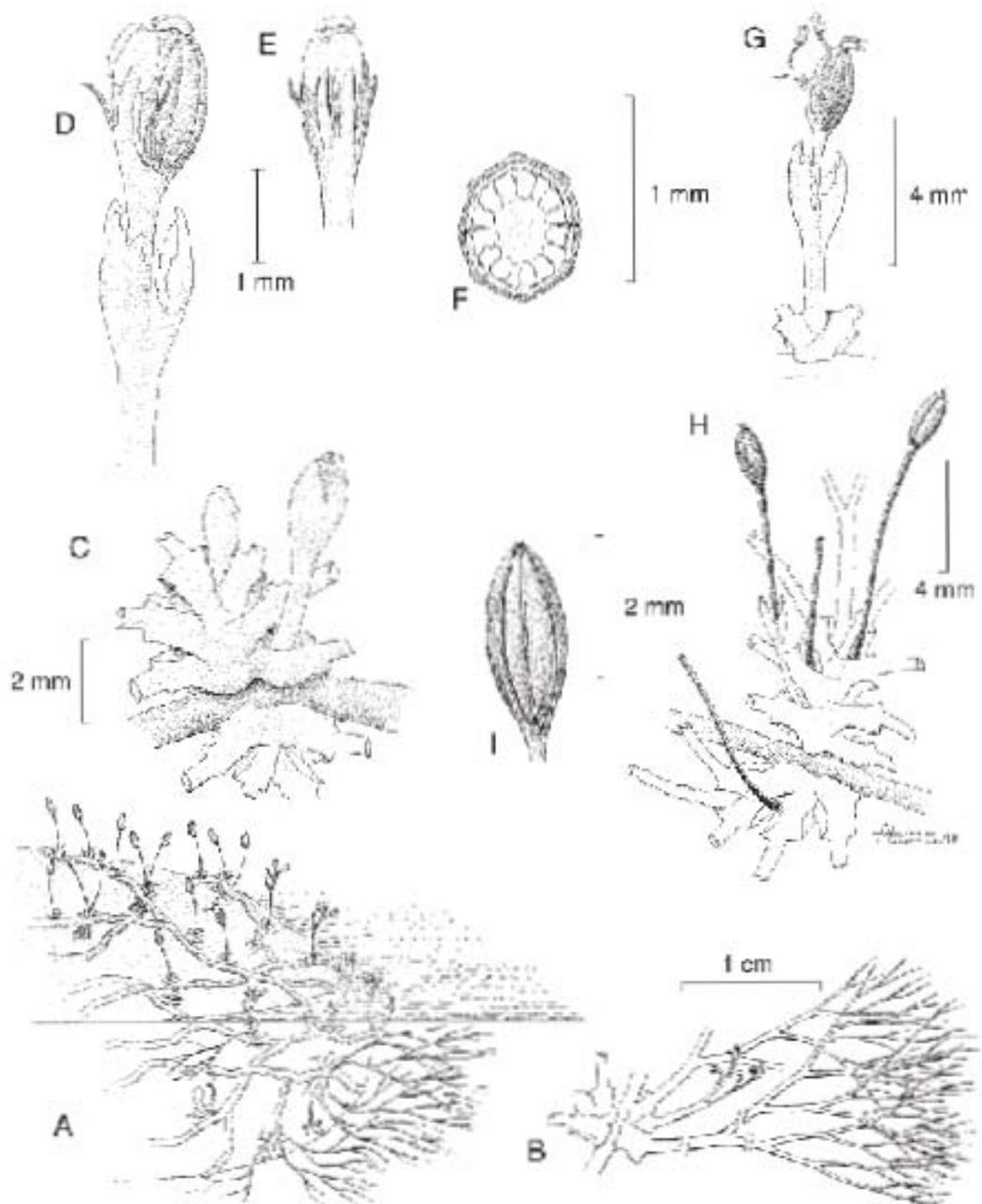


Figura 3. *Noveloa coulteriana*. **A.** Aspecto general de la planta; **B.** Detalle de una raíz de donde emergen nuevos vástagos con hojas sumergidas; **C.** Detalle de las vainas dobles de las hojas de donde emergen las flores; **D.** Flor joven emergiendo de la espata; **E.** Flor joven vista por el lado donde se encuentra el androceo; **F.** Corte transversal del ovario; **G.** Flor madura; **H.** Planta expuesta al aire con frutos maduros; **I.** Detalle de la cápsula. Ilustrado por Albino Luna (Novelo y Philbrick, 2000).

Resultados

- Etapa 1

Noveloa coulteriana presenta flores hermafroditas, el verticilo más externo consiste de tres tépalos pequeños: dos laterales y uno en la base del andropodio (lámina 1 A). El androceo está formado por un andropodio que sostiene de dos (en mayor proporción), a tres anteras (lámina 1 A). El gineceo está constituido por un ovario sincárpico, súpero con estigma bilobulado y carece de estilo (lámina 1 A, B).

El óvulo es anátropo, bitégmico y exóstomo (lámina 1 C, D). El tegumento externo se encuentra compuesto por 4-5 estratos celulares, con abundante contenido de lo que parece almidón (lámina 1 D, 2 A), mientras que el tegumento interno presenta dos estratos celulares, el estrato más interno muestra idioblastos conspicuos (probablemente taninos) con una gran vacuola que adosa el citoplasma a las paredes celulares (lámina 2 B).

Ultraestructura del saco embrionario

El saco embrionario es tetracelular (ovocélula, célula central y dos sinérgidas) en esta etapa (lámina 2 D). Dado que las células que componen al saco embrionario no se encuentran en un solo plano, se pueden observar 2, 3 o 4 células dependiendo la inclinación del corte. En la imagen que se presenta de esta etapa, se observa la célula central y la ovocélula (láminas 1 D y 2 D) y parte de lo que corresponde a una sinérgida. Estas células, que conforman al saco embrionario, son morfológicamente distintas, la célula central presenta un núcleo en donde la cromatina se encuentra compactada (heterocromatina) (lámina 3 B y C), mientras que la célula adyacente, es decir la ovocélula, la de mayor tamaño en el saco embrionario, presenta el material genético más laxo (eucromatina) (lámina D y E), en el extremo micropilar solo es visible una pequeña fracción de lo que corresponde a una de las sinérgidas (lámina 3 B).

Ultraestructura de la nucela

Existen dos tipos de células nucleares, las que rodean al saco embrionario (lámina 2 D y 3 A), que son pequeñas y rectangulares, con pequeñas vacuolas, con núcleos pequeños con cromatina compacta, mientras que las células nucleares de la parte media y del polo calazal son más grande, alargadas, de paredes delgadas y muestran una polaridad en su contenido citoplasmático, el citoplasma y el núcleo se encuentran en el polo micropilar, cercanos al saco embrionario (lámina 2 B, C y 3 A). La nucela en su parte media y calazal se encuentra compuesta de 7 a 8 células, apreciables en un corte transversal (láminas 4 A), mientras que en un corte longitudinal sólo son visibles 3 a 4 células, que se muestran grandes y alargadas (láminas 2 B, C y 3 A). La envoltura nuclear de los núcleos de las células nucleares de la parte media comienza a mostrar signos de ruptura (lámina 4 B, C y 4 E), mientras que aún persisten membranas y paredes celulares íntegras (lámina 4 C, D).

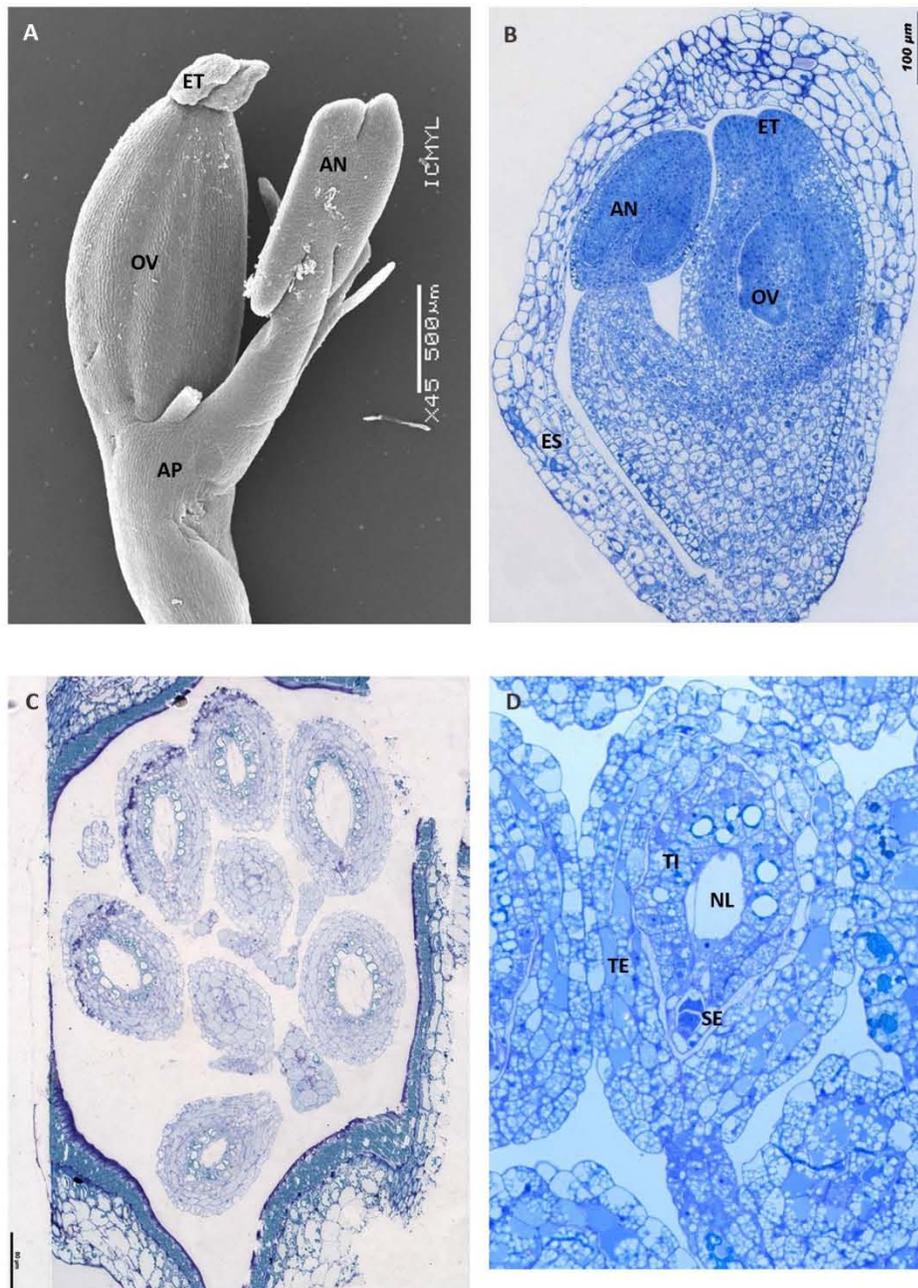


Lámina 1 (Etapa 1) **A.** Micrografía electrónica de barrido y cortes longitudinales de flor en antesis. **B.** Espatela rodeando los órganos reproductivos: androceo y gineceo (estigma y ovario). **C.** Ovario con ocho óvulos. **D.** Óvulo. **AP:** andropodio, **AN:** anteras, **ET:** estigma, **ES:** espatela, **GI:** gineceo, **NL:** nucela, **OU:** Óvulo, **OV:** ovario, **SE:** saco embrionario, **TE:** tegumento externo, **TI:** tegumento interno

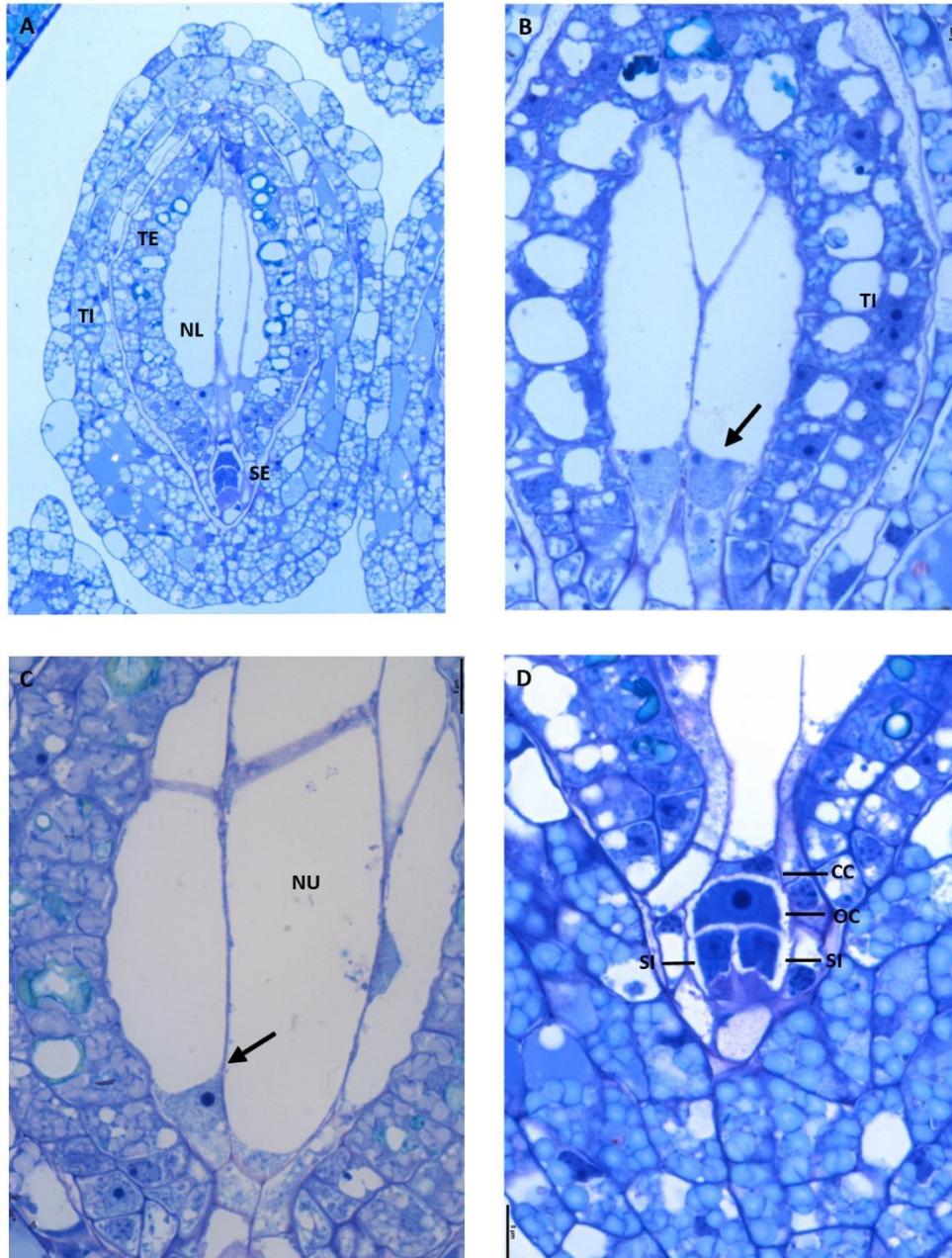


Lámina 2. (Etapa1) Cortes longitudinales. **A.** Óvulo: tegumento externo con 4-5 estratos, tegumento interno con 2 estratos. **B y C.** Acercamiento a la nucela formada por células largas y delgadas, con contenido citoplasmático escaso y presencia de núcleos cercanos al polo micopilar (flecha). **D.** Acercamiento al saco embrionario tetra celular: célula central, ovocélula, dos sinérgidas y aparato filiforme. **CC:** célula central, **OC:** Ovocélula, **SE:** saco embrionario, **TE:** tegumento externo, **TI:** tegumento interno, **NL:** nucela, **SI:** sinérgidas

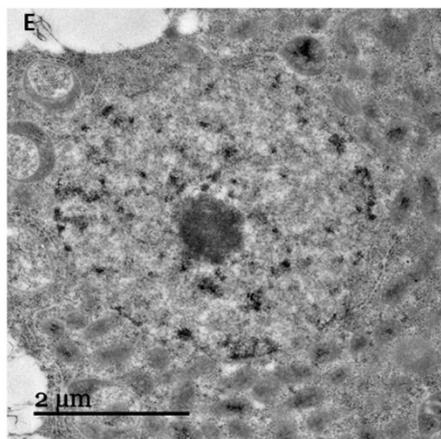
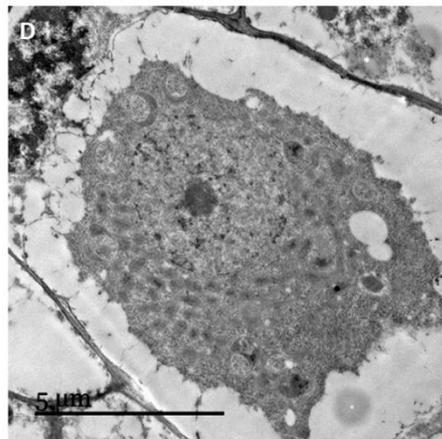
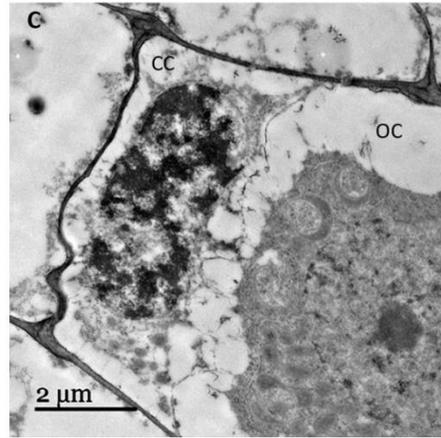
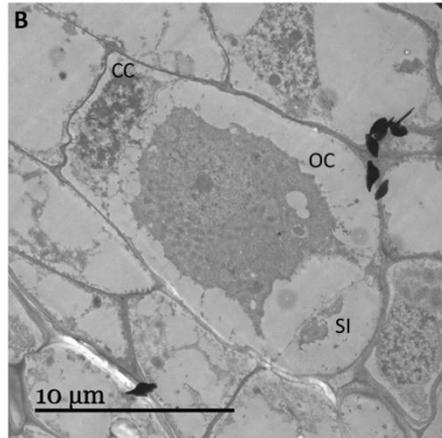
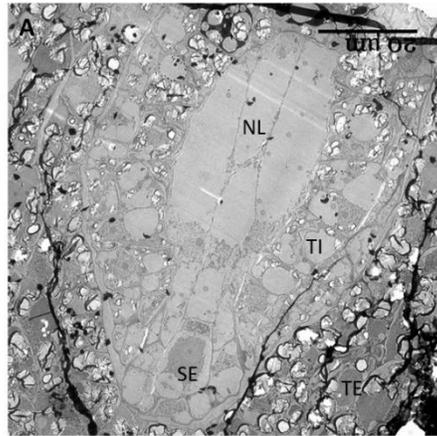


Lámina 3 (Etapa 1). Micrografías electrónicas. Cortes longitudinales. **A.** Panorámica de óvulo. **B.** Panorámica del saco embrionario: la célula central (en el extremo calazal), la ovocélula y una pequeña fracción de las sinérgidas (en el extremo micropilar). **C.** Célula central, concromatina condensada. **D.** Ovocélula. **E.** Núcleo de la ovocélula, la cual presenta una envoltura nuclear bien definida, una cromatina laxa y un nucléolo.

CC: célula central, **NL:** nucela, **NO:** nucléolo, **SE:** saco embrionario, **OC:** ovocélula, **TE:** tegumento externo, **TI:** tegumento interno, **SE:** saco embrionario : **SI** Sinérgidas

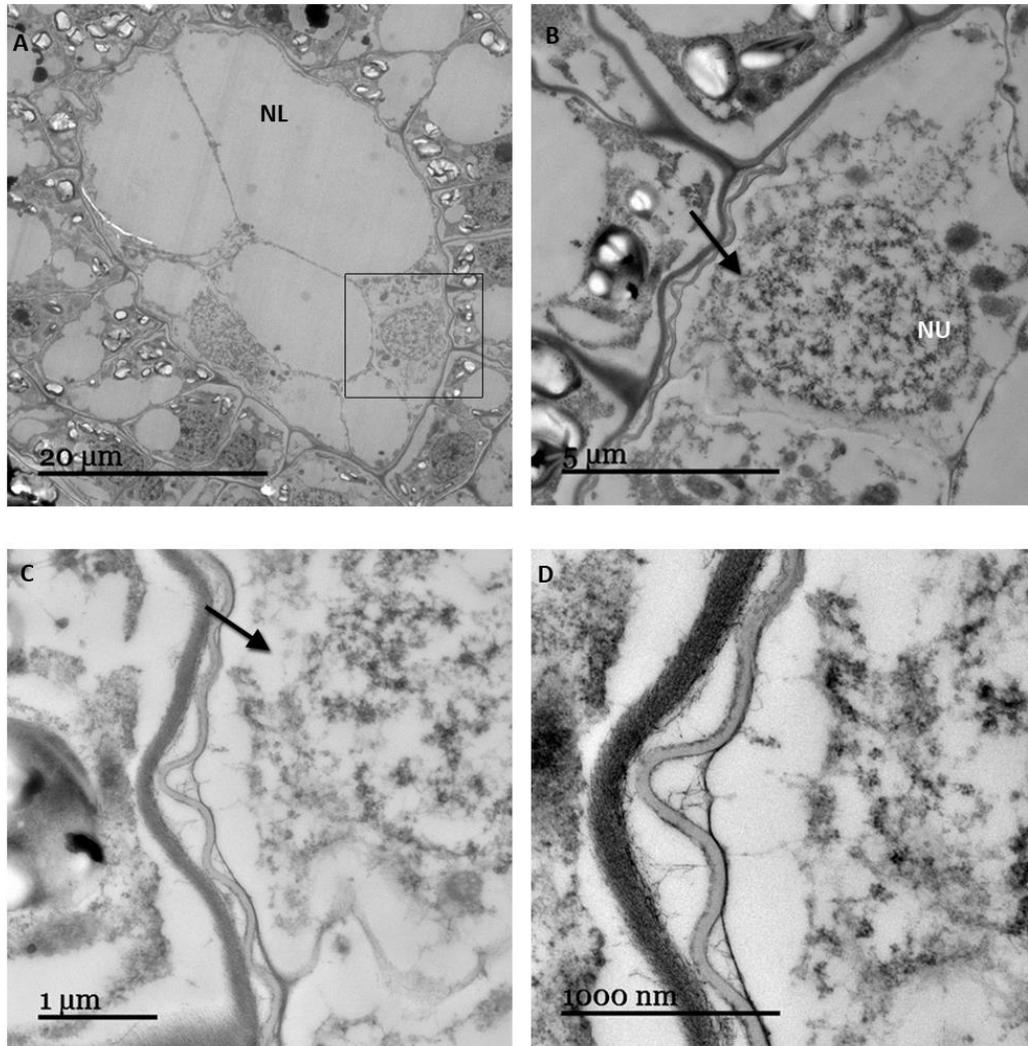


Lámina 4. (Etapa 1). Micrografías electrónicas. Cortes transversales. A. Nucela con células alargadas y presencia de núcleos (cuadro). B. Acercamiento del cuadro en A, donde se aprecia detalle de un núcleo de la nucela. C. Acercamiento (cuadro) de una célula nucelar colindando con una célula del tegumento interno, en donde se aparecía las capas que las separan: pared celular, cutícula y membrana celular. D. acercamiento a restos de la envoltura nuclear, la flecha señala el rompimiento de la envoltura nuclear de la célula nucelar. CU: Cutícula, ME: membrana, NU: Nucela, PC: Pared Celular, TI: Tegumento interno.

- Etapa 2

Los tegumentos del óvulo continúan sin cambios en el número de estratos y contenido celular (lámina 5 A), mientras que el saco embrionario ahora es tricelular, debido a que la célula central ha degenerado, quedando solamente como una media luna, dos sinérgidas y la ovocélula. La ovocélula presenta muchas vacuolas que desplazan al núcleo hacia el polo micropilar (lámina 5 B). Las células nucelares de la zona media, aún se encuentran presentes, pero con paredes adelgazadas (lámina 5), con contenido citoplasmático escaso y los núcleos mostrando una lisis más avanzada. En ciertas regiones no existe una clara diferencia entre el contenido nuclear y citoplasmático (lámina 5 D).

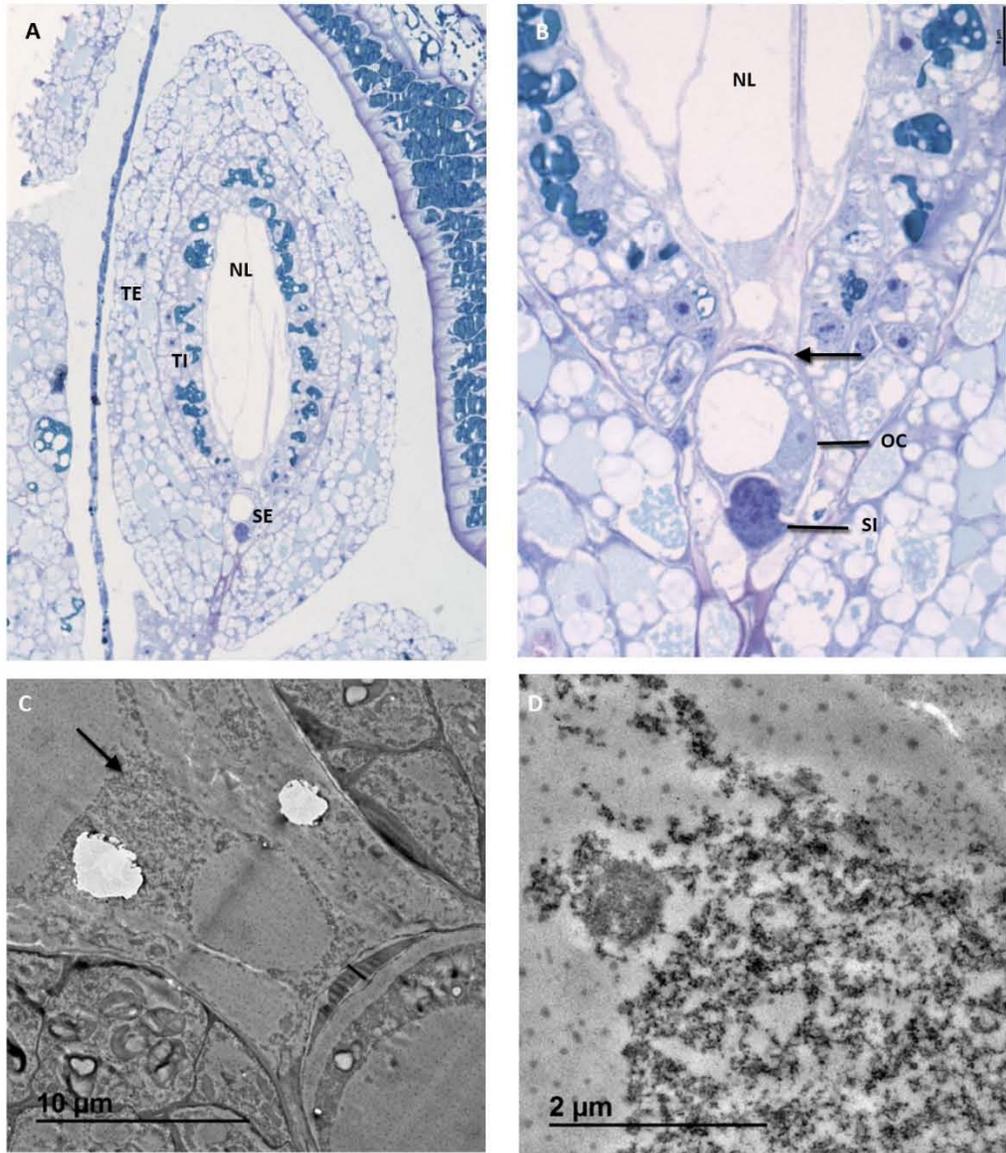


Lámina 5. (Etapa 2). Cortes longitudinales. **A.** Óvulo. **B.** Saco embrionario, en el extremo calazal restos de la célula central (flecha), después la ovocélula, y en el extremo micropilar contenido celular perteneciente a una sinérgida. Micrografías electrónicas. **C.** Núcleo perteneciente a la nucela (flecha). **D.** Acercamiento al rompimiento de la envoltura nuclear. **CC:** célula central, **NL:** nucela, **OC:** ovocélula, **SE:** saco embrionario, **SI:** sinérgidas **TE:** tegumento externo, **TI:** tegumento interno.

- Etapa 3

En la semilla joven, los tegumentos permanecen con su misma estructura (lámina 7 A). Las paredes celulares de la nucela, cercanas al polo calazal, se encuentran adelgazadas pero aún integra (lámina 7), mientras que las células nucelares, que rodean al embrión, empiezan a mostrar signos más avanzados de degeneración (lámina 7 B). No ha ocurrido aún la formación del plasmodio nucelar, ya que aún persiste la integridad en las paredes celulares de la nucela, pero los núcleos, además de presentar una progresiva lisis, comienzan a presentar invaginaciones y vacuolas en el núcleo, posibles signos de muerte celular (lámina 8). La ovocélula ya fue fecundada y se encuentra en etapa de embrión tetracelular, las sinérgidas persisten, pero presentan síntomas de degeneración (lámina 6 B).

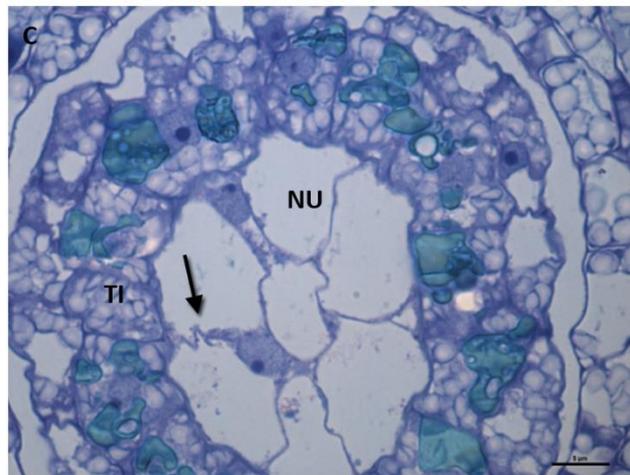
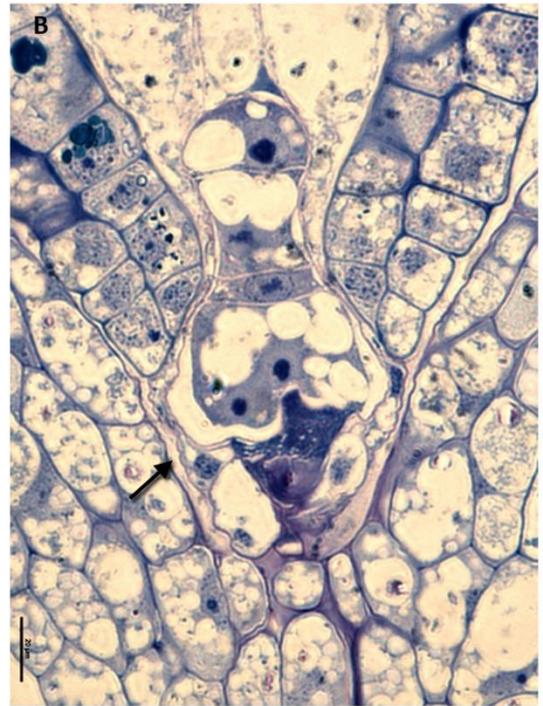
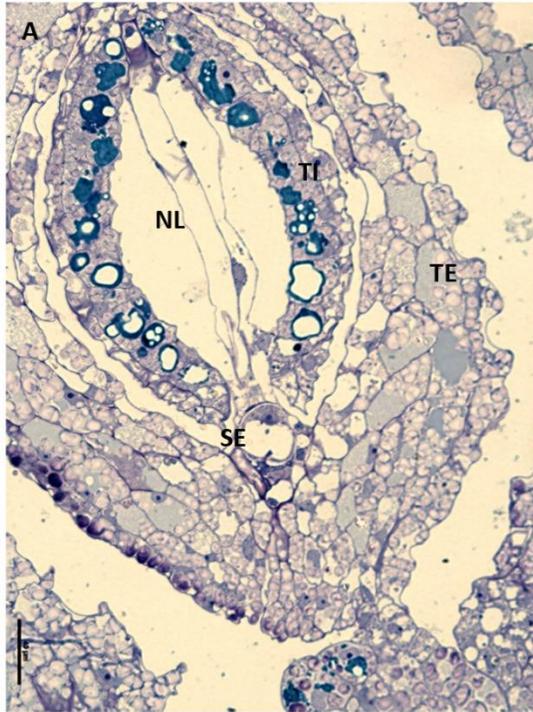


Lámina 6. (Etapa 3). Cortes longitudinales. **A.** Ovulo. **B.** Embrión multicelular, las flechas señalan la capa adelgazada y próxima a la degradación de la nucela que rodea al embrión. **C.** Corte transversal de nucela. Las células nucelares presentan paredes delgadas y sinuosas (flecha), el contenido citoplasmático es casi ausente con excepción de los núcleos. **CC:** célula central, **EM:** embrión, **NL:** nucela, **NO:** nucléolo, **TE:** tegumento externo, **TI:** tegumento interno

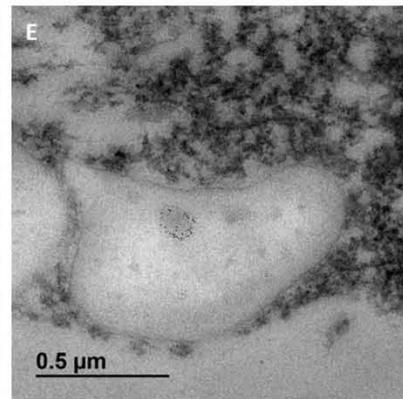
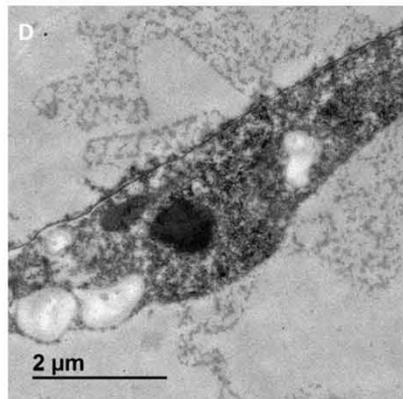
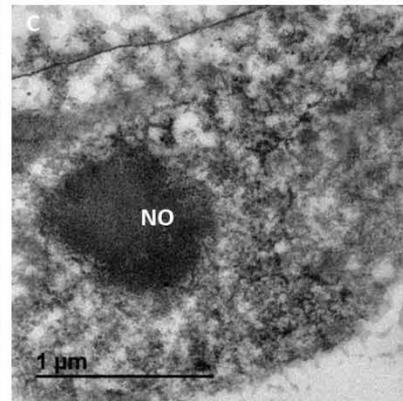
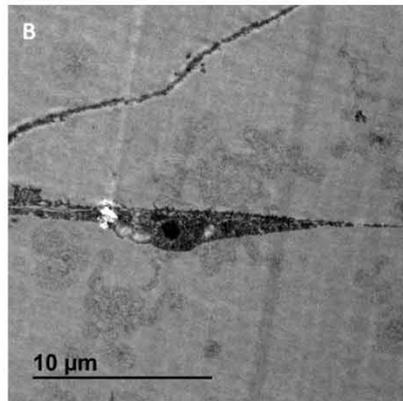
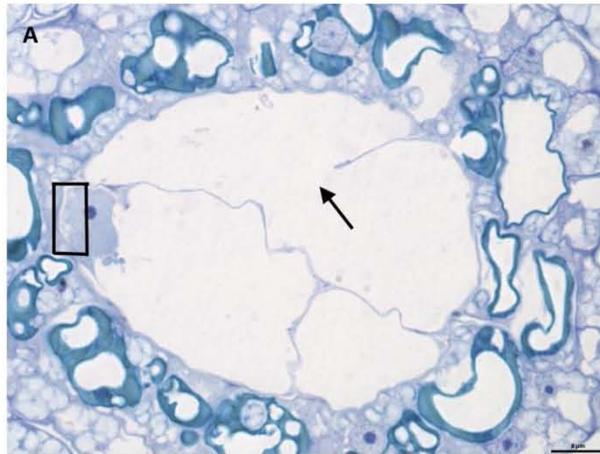


Lámina 7. (Etapa 3). **A.** Corte transversal de nucela. Las paredes de las células nucelares son sinuosas y delgadas, se empiezan a romper algunas paredes (flecha), los núcleos comienzan a presentar invaginaciones y presentan vacuolas (rectángulo). Micrografías electrónicas. **B.** Núcleo de una célula nucelar. **C.** Acercamiento al nucléolo en donde ya no se pueden distinguir las partes que lo componen. **D.** y **E.** acercamiento al núcleo, donde son evidentes las vacuolas. **NU:** núcleos, **NO:** Nucléo

Discusión

Los caracteres embriológicos son clave para definir a la familia Podostemaceae, como: un saco embrionario reducido, la ausencia de endospermo y la formación de un plasmodio nucelar (Kapil, 1970). En este trabajo se abordó el estudio del desarrollo del plasmodio nucelar, ya que no solamente define a la familia, sino que el momento de su formación es un carácter diagnóstico, que ha contribuido a la separación de las tres subfamilias: Podostemoideae, Tristichoideae y Weddellinoideae (Jäger-Zürn, 1997).

En *Noveloa coulteriana* no se observó la formación de un plasmodio nucelar propiamente dicho, desde la etapa de saco embrionario inmaduro (cuatro células), sino hasta la formación del embrión tetracelular, etapas de estudio que abarcó esta investigación. Esto coincide con lo reportado por Murguía-Sánchez (2003), quien menciona que en etapa de saco embrionario tetracelular, “en donde las células nucleares, pese a estar adelgazadas no formaban claramente un plasmodio nucelar”. La formación del plasmodio nucelar es una característica embriológica distintiva en la familia (Went, 1908), pero hay diferencias a nivel de subfamilia en el momento de su formación (Mukkada y Chopra, 1973; Arekal y Nagendran, 1975; Jäger-Zürn, 1997). Lo observado en *N. coulteriana* no coincide con lo reportado para la subfamilia, ya que en Podostemoideae, la etapa en que se forma el plasmodio nucelar es antes de que el saco embrionario sea tetracelular (Razi, 1949; Arekal y Nagendran, 1977a; Nagendran et al., 1977, Arekal y Nagendran, 1977a; Murguía, 2003), tampoco coincide con lo reportado para la subfamilia Weddellinoideae, en su especie monotípica *Weddellina squamulosa*, en donde el momento de formación ocurre cuando el saco embrionario se encuentra maduro (tetracelular), de hecho éste es un tercer patrón, solo reportado en esta especie (Jäger-Zürn, 1997). En Tristichoideae, la formación del plasmodio nucelar ocurre después de la fecundación. Como ya se dijo, el momento de formación es diagnóstico a nivel subfamilia, pero aun así existen variaciones dentro de cada subfamilia; por ejemplo,

en esta última, en *Lawia zeylanica* (Razi, 1949), ocurre inmediatamente después de la fecundación, mientras que en *Indotristicha ramosissima* (Chopra y Mukkada, 1996) ocurre hasta que se forma el cigoto.

El plasmodio nucelar es un término dado para definir una estructura embriológica que caracteriza a la familia Podostemaceae, pero que no siempre ha sido usado, su concepto, así como su nombre, ha cambiado a lo largo de su historia. Fue Went (1908) quien para referirse “a una cavidad con protoplasma, resultado de la degradación de las paredes nucleares”, acuñó el término “pseudo-saco embrionario” y Razi (1949) estuvo de acuerdo en que al romperse las paredes nucleares, se liberan núcleos alargados y atróficos. Posteriormente, Mukkada (1969) reporta en una especie de la subfamilia Tristichoideae que “contrariamente a los informes de Razi (1949), estas células permanecen intactas hasta el momento de la fecundación, con núcleos sanos”, de igual manera Jáger-Zúrn (1967), en desacuerdo con Went y Razi postula que los núcleos que componen al pseudo-saco embrionario se encuentran en buen estado (no atróficos), aunque posteriormente (1997), cuando habla de *Weddellina squamulosa* menciona que “parecen no degenerar, pero asegurar el estado de los núcleos, ya sean sanos o atróficos se encuentra fuera del alcance de su investigación”. Arekal y Nagendran (1975), no solo están en desacuerdo con Went y Razi, en cuanto a la integridad de los núcleos del pseudo-saco embrionario, sino que consideran que es más apropiado referirse a un “plasmodio nucelar”, en lugar de un pseudo-saco embrionario, ya que no simula un saco embrionario ni en su ontogenia, apariencia o función y es etimológicamente más correcto definirlo como un plasmodio nucelar. Es a partir de este momento que se comienza a usar el término plasmodio nucelar, así como que los núcleos que lo componen se encuentran sanos (no atróficos). El presente trabajo coincide con lo reportado en un principio por Went (1908) y Razi (1949) ya que en *Noveloa coulteriana*, pese a que no se observó la formación del plasmodio nucelar en las etapas aquí estudiadas, si se pudo confirmar, a través de la microscopía electrónica, que los núcleos que componen a la nucela son atróficos y presentan un rompimiento en su envoltura nuclear y vacuolas (muerte celular programada). De

manera tal que una vez que se rompan las paredes, de la nucela para formar un plasmodio, los núcleos que la conformen se encontrarán completamente atróficos.

Este es un punto importante de consideración, ya que este plasmodio nucelar es un carácter único en la familia. Con lo reportado en el presente trabajo, lejos de solo comprobar el estado atrófico de los núcleos de la nucela, se pone en consideración, para trabajos posteriores, el término y la función del plasmodio nucelar en *Noveloa coulteriana*, ya que, como mencionó Jáger-Zúrn (1967), “esta cavidad parece un espacio -vacío- vacuolizado sin actividad, que a un plasmodio” . Se ha pensado a lo largo de la historia, que la familia Podostemaceae al no formar un endospermo por la degeneración de la célula central antes de la fecundación, el plasmodio nucelar (pseudo-saco embrionario en un principio) es el que se encargaría de nutrir al saco embrionario y posteriormente al embrión (Magnus, 1913; Razi, 1949; Mukkada, 1964; Nagendran *et al.*, 1977). Los resultados de esta investigación no apoyan el papel nutricional activo de la nucela o sus restos, como ha señalado la literatura.

Conclusiones

- Dado que un plasmodio se define como una masa citoplasmática con núcleos morfológicamente bien formados, ésta no corresponde con lo observado en *N. coulteriana*, dado que el estado de los núcleos, que componen a la nucela, se encuentran atróficos, desde la primera etapa estudiada.
- *Noveloa coulteriana* no coincide con el modelo establecido para la subfamilia Podostemoideae, a la que pertenece, con respecto a la formación del plasmodio nucelar.
- Se pone a discusión el concepto de “plasmodio nucelar” en *N. coulteriana*.

Literatura citada

- Arekal G. D. y C. R. Nagendran. 1975. Embryo sac of *Hydrobryopsis sessilis* (Podostemaceae) Origin, organization and significance. *Botaniska Notiser* 128: 332-337.
- Arekal G. D y C. R. Nagendran. 1977a. Female gametophyte of *Zeylanidium* (Podostemaceae)- a clarification. *Phytomorphology* 27: 123-129.
- Arekal G. D. y C. R. Nagendran. 1977b. The female gametophyte in two Indian genera of Tristichoideae (Podostemaceae)- A reinvestigation. *Proceedings of the Indian Academy of Science* 86: 287-294.
- Chaudhary A., P. Khanduri, R. Tandon, P. L. Uniyal y H. M. Mohan Ram. 2014. Central cell degeneration leads to three-celled female gametophyte in *Zeylanidium lichenoides* Engl. (Podostemaceae). *South African Journal of Botany* 91: 99-106.
- Chopra R. N. y A. J. Mukkada. 1996. Gametogenesis and pseudo-embryo sac in *Indotristicha ramosissima* (Wight) Van Royen. *Phytomorphology* 16: 182-188.
- Davis G. 1966. Systematic embryology of the Angiosperms. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Endress P. K. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany*, 107(9), 1465-1489
- Johri B., K. Ambegaokar y P. Srivastava. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. New York. 1221 pp
- Jäger-Zürn I. 1967. Embryologische untersuchungen an vier Podostemaceen; *Öster. Bot. Zeits* 114: 20-45. En: Arekal G. D. y C. R. Nagendran. 1977b. The female gametophyte in two Indian genera of Tristichoideae (Podostemaceae)- A reinvestigation. *Proceedings of the Indian Academy of Science* 86: 287-294

- Jäger-Zürn I. 1997. Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichoideae). *Aquatic Botany* 57: 151-182
- Jäger-Zürn I. y M. Grubert. 2000. Podostemaceae depend on sticky biofilms with respect to attachment to rocks in waterfalls. *International Journal of Plant Sciences* 161(4): 599-607.
- Kapil R. N. 1970. Podostemaceae. *Bulletin of the Indian National Science Academy* 41. 104-109. En: Chaudhary A., P. Khanduri, R. Tandon, P. L. Uniyal y H. M. Mohan Ram. 2014. Central cell degeneration leads to three-celled female gametophyte in *Zeylanidium lichenoides* Engl. (Podostemaceae). *South African Journal of Botany* 91: 99-106
- Koi, S., Kita, Y., Hirayama, Y., Rutishauser, R., Huber, K. A., & Kato, M. (2012). Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(3), 461-492.
- Martínez M. 2013. Las angiospermas. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Santana (Editoras). *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. p: 4 -10.
- Mukkada A. 1969. Some aspects of the morphology, embryology and biology on *Terniola zeylanica* (Gardner) Tulasne. *New Phytologist* 68: 1145-1158
- Mukkada. A. J. y R. N. Chopra. 1973. Post-fertilization development in *Indotristicha ramosissima* (Wight) Van Royen. *New Phytologist* 72: 639-646
- Murguía-Sánchez G. 2003. Embriología comparada de los géneros de la familia Podostemaceae en México. Tesis de doctorado (Biología), Posgrado en ciencias biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 125 pp
- Nagendran C. R. , G. D. Arekal, K. Subramanyam. 1977. Embryo sac in Three Indian Species of Polypleurum (Podostemaceae). *Plant Systematics and Evolution* 128: 215-226.
- Novelo A. y T. Philbrick. 1997. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. *Aquatic Botany* 57: 275-303.

- Novelo A. y C. T. Philbrick. 2000. PODOSTEMACEAE. Fascículo 87.
- O' Neill. S. P., J. M. Osborn, C. T. Philbrick, A. Novelo. 1997. Comparative pollen morphology of New World genera of Podostemaceae. *Aquatic Botany* 57: 133-150.
- Philbrick C. T. y A. Novelo. 1995. New world Podostemaceae: Ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia* 47: 210-222.
- Yadegari R. y G. N. Drews. 2004. Female gametophyte development. *The Plant Cell* 16 (1): S133-S141.
- Raghavan V. 2006. *Double fertilization: embryo and endosperm development in flowering plants*. Springer Science & Business Media.
- Razi B. A. 1949. Embryological studies of two members of the Podostemaceae. *Botanical Gazette* 111 (2): 211-218.
- Rutishauser R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river- weeds). *Aquatic Botany* 57: 29-70.
- Sreenivasulu N. y U. Wobus. 2013. Seed-Development Programs: A Systems Biology-Based Comparison Between Dicots and Monocots. *Annual Review of Plant Biology* 64: 189-217.
- Tippery N. P., C. T. Philbrick, C. P. Bove y D. H. Les. 2011. Systematics and Phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany* 36(1): 105-118.
- Went F. A. F. C. 1908. The development of the ovule, embryo-sac and egg in Podostemaceae. *Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW)* 10 11: 824-832.
- Williams J. H. y W. E. Friedman. 2002. Identification of diploid endosperm in an early angiosperm lineage. *Nature* 415:522-526.

