

ONTOGENIA DEL ESPORANGIO Y ESPOROGÉNESIS DEL LICOPODIO
Huperzia phyllicifolia (Desv. ex Poir.) Holub (LYCOPODIACEAE)

JACINTA MIREYA DORADO GALVEZ



UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011

ONTOGENIA DEL ESPORANGIO Y ESPOROGÉNESIS DEL LICOPODIO
Huperzia phyllicifolia (Desv. ex Poir.) Holub (LYCOPODIACEAE)

JACINTA MIREYA DORADO GALVEZ

Tesis de grado como requisito para optar al título de Bióloga

Director

Edgar Javier Rincón Barón
Biólogo Universidad Industrial De Santander
Semillero Ecológico
Candidato a Doctorado
Universidad Del Valle

Asesor

M.Sc Gerardo Andrés Torres
Docente Programa De Biología

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011

Nota de aceptación

Director _____
Edgar Javier Rincón Barón
Candidato a Doctorado Univalle

Asesor _____
Gerardo Andrés Torres
Docente Biología Unicauca

Jurado _____
Diego Macías Pinto
Docente Biología Unicauca

Jurado _____
Sandra Rivas
Docente Biología Unicauca

Fecha de sustentación: Popayán, 05 de Agosto de 2011

DEDICATORIA

A mis padres Sonia y Francisco por todo su amor, esfuerzo, dedicación, apoyo incondicional y comprensión durante mi formación.

A mi hijo Andrés Esteban el motor de mi vida quien me impulsa para seguir luchando en pro de un mejor futuro.

A Hugo por todo su amor y cariño.

A mi hermana Marcela y sobrina Ingrid por su amor y compañía por toda su colaboración.

A todos mis familiares que de una u otra manera aportaron tanto en mi formación profesional como personal.

A la memoria de mi hermana Ingrid por todos sus buenos y sabios consejos en el momento indicado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme la vida, guiar cada uno de mis pasos, y regalarme una familia maravillosa.

A Edgar Javier Rincón por sus aportes, conocimientos y asesorías durante el desarrollo del trabajo de grado.

Al profesor Gerardo Andrés Torres, Director de la Unidad de Microscopía y asesor del trabajo por su colaboración en la revisión del documento.

A Lyda Patricia Mosquera Nilza Palomino de la Unidad de Microscopía Electrónica por sus aportes para la realización de este trabajo.

Al profesor Bernardo Ramírez por su colaboración en la identificación de la planta.

A la Universidad del Cauca por brindarme su espacio para mi formación profesional y personal.

A los profesores del departamento de Biología con los que tuve la oportunidad de compartir dentro y fuera de un aula de clase y cuyas enseñanzas fueron aportes importantes para mi formación personal y como Bióloga.

A cada uno de mis compañeros con los cuales tuve la fortuna de compartir los mejores momentos de nuestra carrera.

A todas las personas que con sus consejos me permitieron corregir mis errores y crecer como persona.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2. JUSTIFICACION	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 GENERAL.....	16
3.2 ESPECIFICOS.....	16
4. MARCO TEORICO.....	17
5. ANTECEDENTES	20
6. MATERIALES Y METODOS	23
6.1 AREA DE ESTUDIO	23
6.2 DESCRIPCIÓN DE LA ONTOGENIA DEL ESPORANGIO Y EL PROCESO DE ESPOROGÉNESIS DE <i>H. PHYLICIFOLIA</i>	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1 DESCRIPCIÓN DE LA ONTOGENIA DEL ESPORANGIO Y EL PROCESO DE ESPOROGÉNESIS DE <i>H. PHYLICIFOLIA</i>	25
7.2. PRUEBAS HISTOQUÍMICAS.....	31
7.2.1. IDENTIFICACIÓN DE ALMIDÓN DURANTE EL PROCESO DE ESPOROGÉNESIS DE <i>H. PHYLICIFOLIA</i>	31
7.2.2. IDENTIFICACIÓN DE MATERIALES LIPÍDICOS DURANTE EL PROCESO DE ESPOROGÉNESIS DE <i>H. PHYLICIFOLIA</i>	32
7.2.3. IDENTIFICACIÓN DE MUCOPOLISACARIDOS CON LA COLORACIÓN DE ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS), CONTRASTADO CON HEMATOXILINA DE HARRIS.....	34
7.2.4. IDENTIFICACIÓN DE MUCOPOLISACARIDOS SULFATADOS CON LA COLORACIÓN DE AZUL DE ÁLCIAN, CONTRASTADO CON HEMATOXILINA DE HARRIS.	36
7.3 MORFOMETRÍA DE ALGUNAS ESTRUCTURAS ASOCIADAS AL ESPORANGIO Y LAS ESPORAS DE <i>H. PHYLICIFOLIA</i>	38
8. DISCUSION	40
9. CONCLUSIONES	46
10. RECOMENDACIONES.....	48
11. LITERATURA CITADA.....	49

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Ubicación de la zona de recolecta. Fuente: Google Earth.....	23
Fig. 2-3. Vista de <i>H. phyllicifolia</i>	25
Fig. 4-7. Primeras etapas de la ontogenia del esporangio de <i>H. phyllicifolia</i> . Tinción con safranina- fast green. Cortes permanentes.....	28
Fig. 8-13. <i>H. phyllicifolia</i> , esporocitos maduros y meiosis I.....	29
Fig. 14-19. <i>H. phyllicifolia</i> , meiosis II y tétradas en diferentes etapas de maduración.....	30
Fig. 20-21. Esporas maduras y células de la pared de <i>H. phyllicifolia</i>	31
Fig. 22-29. Tejido esporógeno, esporocitos, tétradas y esporas de <i>H. phyllicifolia</i> coloreadas con lugol.....	32
Fig. 30-35. Tejido esporógeno, esporocitos, tétradas y esporas de <i>H. phyllicifolia</i> coloreados con Sudan III.....	34
Fig. 36-41. Identificación de mucopolisacáridos durante la esporogénesis de <i>H. phyllicifolia</i> utilizando la tinción de PAS.....	36
Fig. 42-50. Identificación de mucopolisacáridos sulfatados durante la esporogénesis de <i>H. phyllicifolia</i> utilizando la tinción de azul de alcian.....	37
Fig. 51-52. Florescencia de las estructuras implicadas en la esporogénesis utilizando radiación ultravioleta de preparados en parafina teñidos con azul de anilina para detectar la presencia de calosa.....	39

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE <i>H. PHYLICIFOLIA</i>.	39
--	-----------

RESUMEN

En esta investigación se realiza una descripción de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis del licopodio *H. phyllicifolia*; teniendo en cuenta que existen pocos estudios sobre el tema. El material vegetal fue recolectado en el municipio Puracé-Coconuco (Cauca-Colombia). Los estróbilos fueron fijados y se procesaron de acuerdo con las técnicas convencionales para inclusión en parafina. Secciones de 3-5 μm fueron teñidas con safranina-fast green, reactivo de Schiff, azul de alcian, y azul de anilina, también se realizaron montajes de material fresco con acetoceína láctica. Los montajes se examinaron con un microscopio fotónico de alta resolución equipado con DIC (contraste diferencial de interferencia) y un microscopio de fluorescencia. Se observó que los esporangios se localizan en las axilas de los esporófilos, en la zona de inserción con el eje caulinar, y maduran de forma basípeta. El desarrollo se inicia a partir de un grupo de células epidérmicas que se dividen activamente por mitosis formando un estrato celular externo y otro interno. El primero da origen a la pared del esporangio con varios estratos celulares de los cuales el estrato celular interno se diferenciará para formar el tapete, el estrato celular externo que desarrollara engrosamientos en las paredes anticlinales y en la periclinal interna y los demás estratos se degradan durante la maduración del esporangio. El estrato celular interno da origen al tejido esporógeno que luego constituirá los esporocitos los cuales experimentan meiosis I hasta la etapa de diada. La meiosis II culmina con la formación de tétradas, constituidas por esporas en disposición tetraédrica. Las esporas son foveoladas con lesura trirrasgada. El análisis histoquímico fué positivo para mucopolisacáridos, almidones, lípidos y negativo para calosa, como tampoco se observó la presencia de canales de mucilago.

Palabras clave: *Huperzia*, Lycopodiaceae, Pteridophyta, ontogenia del esporangio, esporogénesis, esporas.

ABSTRAC

This research is a description of the ontogeny of sporangia and sporogenesis of lycopodium. *H. phyllicifolia*, bearing in mind there are few studies on the subject. The plant material was collected in the municipality Purace-Coconuco (Cauca, Colombia). Strobili were fixed and processed according to conventional techniques for paraffin embedding. Sections of 3-5 microns were stained with safranin-fastgreen, Schiff reagent, alcian blue and aniline blue, were also mounts of fresh material with lactic acetoceína. The mounts were examined with a high resolution photonic microscope equipped with DIC (differential interference contrast) and a fluorescence microscope. It was noted that the sporangia are located in the axils of the sporophylls in the area of insertion with the stem rot, and mature in basipetal way. The development starts from a group of epidermal cells that are actively dividing by mitosis to form a cell layer external and one internal. The first gives rise to the wall of the sporangium with several cell layers which the inner cell layer differentiate to form the mat, the outer cell layer to develop on the walls thickened anticlinal and periclinal in the inner and the other layers are degraded during maturation of the sporangium. The inner cell layer gives rise to the spore-forming tissue that then constitute the esporocitos which undergo meiosis I to the stage of dyad. Meiosis II ends in the formation of tetrads, consisting of spores in tetrahedral arrangement. Spores are foveolate with lesur trirasgada. Histochemical analysis was positive for mucopolysaccharides, starches, lipids and callose negative, nor showed the presence of mucilage canals.

Palabras clave: *Huperzia*, Lycopodiaceae, Pteridophyta, ontogenia del esporangio, esporogénesis, esporas.

INTRODUCCION

Las Lycopodiáceas son una familia de distribución geográfica amplia y cosmopolita, constituida por cuatro géneros con aproximadamente 500 especies (Øllgaard 1992); en América se encuentran ampliamente distribuidas desde Alaska hasta la Tierra del Fuego (Tryon & Tryon 1982). La familia se distribuye desde el nivel del mar hasta 4400 metros de altitud, la mayoría por encima de los 2500 y varias por encima de los 4000. Generalmente ocupan la mayor parte de zonas de vida con posible excepción de los desiertos (Santa 1986). *Huperzia* Bernh. es el género mejor representado en el neotropico, con unas 300 especies (Øllgaard 1992), de las que unas 69 serían endémicas de los Andes de Colombia, Ecuador y Perú. *Huperzia phyllicifolia* (Desv. ex Poir.) Holub, se encuentra desde Costa Rica hasta Bolivia y en Colombia prospera en la región Andina y en las cordilleras Central y Occidental desde Antioquia hasta Nariño, en alturas comprendidas entre 2850 y 3650 m Murillo & Murillo (1999).

Los estudios en Lycopodiáceas son diversos, estas han sido muy estudiadas desde el punto de vista de la taxonomía y sistemática. Por el contrario los trabajos sobre su biología reproductiva son escasos (Sikes 1908, Wilce 1972, Øllgaard 1975, Rolleri 1979, Uehara & Kurita 1991, Solé de Porta & Murillo-Pulido 2005, Pita *et al.* 2006, Rincón *et al.* 2009, Rolleri *et al.* 2010). Existen buen número de trabajos sobre reproducción pero la mayoría hacen referencia a la descripción de la fase sexual (Bruce 1979, Whittier, & Webster 1986, Whittier 1998, Whittier 2003, Whittier *et al.* 2005, Whittier 2006, Whittier & Carter 2007, Whittier & Storchova 2007).

Algunos trabajos realizados en licopodios, monilófitos y briófitos sugieren que los caracteres estructurales y ultraestructurales de los procesos reproductivos pueden contribuir a una mejor delimitación taxonómica y sistemática de estos grupos. (Wilce 1972, Brown & Lemmon 1990, Tryon & Lugardon 1991, Renzaglia *et al.* 2000, Grauvogel-Stamm & Lugardon 2009).

Teniendo en cuenta lo anterior este trabajo hace una descripción detallada de las estructuras de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis del licopodio *H. phyllicifolia* de material recolectado en el municipio de Puracé-Coconuco, utilizando microscopía fotónica de alta resolución y pruebas histoquímicas como azul de alcian, ácido periódico de Schiff (PAS), azul de anilina, lugol y sudán III, ya que

mediante estas técnicas se pueden identificar compuestos que se localizan en una estructura en particular; como mucopolisacáridos, lípidos, calosa, almidón, que intervienen en el desarrollo y formación de las esporas. También, se realizaron montajes en fresco para identificación de estructuras que se puedan perder en las técnicas de procesamiento de las muestras en parafina e importantes durante el proceso de esporogénesis. El objetivo principal de este trabajo fue describir la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de la especie *H. phyllicifolia* con lo cual se aportan datos nuevos y originales sobre la biología reproductiva de las licopodiáceas encontradas en Colombia.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La biología reproductiva de los licopodios ha sido poco estudiada y la mayor parte de los trabajos se basan en la descripción del desarrollo de la fase sexual (Bruce 1979, Whittier & Webster 1986, Whittier 1998, Whittier 2003, Whittier *et al.* 2005, Whittier 2006, Whittier & Carter 2007, Whittier & Storchova 2007). Siendo escasos aquellos que analizan el proceso de ontogenia de los esporangios y la esporogénesis Uehara & Kurita (1991) describen la formación de la pared de las esporas y algunos detalles del proceso de esporogénesis en *Lycopodium clavatum* L. y posteriormente, Rincón *et al.* (2009), describen los procesos ontogénicos de los esporangios y esporogénesis del licopodio *Huperzia brevifolia*; un trabajo amplio, detallado y el único hasta el momento sobre la esporogénesis del género.

En Colombia los trabajos de la familia Lycopodiaceae son escasos; Santa (1986) describe la anatomía del tallo de 54 muestras de esta familia, Santa (1989) afirma que la familia está representada por 39 especies andinas y posteriormente Murillo & Harker (1990) en un estudio más extenso citan 57 especies en el país que se distribuyen desde el nivel del mar hasta 4600 metros de altura.

Murillo & Murillo (1999) determinan que Colombia cuenta con 57 especies distribuidas desde el nivel del mar hasta los 4500 metros de altitud; de estas, 42 especies corresponden a *Huperzia*, nueve a *Lycopodiella* Holub. y cuatro a *Lycopodium* L.; sin embargo, como estos autores lo indican, el número podría ser mayor, dado que los datos proceden de floras locales o de los escasos trabajos disponibles hasta el momento en este grupo. Además, es de considerar que Colombia, Ecuador y Perú son lugares de endemismos de estas plantas (Øllgaard 1988).

Lycopodiaceae es una familia con caracteres poco diferenciables y por lo tanto se presenta gran confusión al tratar de definir los taxones. Se ha dado importancia a características morfológicas externas como el tamaño de la hoja, diámetro del tallo para separar especies (Murillo & Murillo 1999). Sin embargo, en la mayoría de los casos las características morfológicas externas son insuficientes y se hace necesario buscar otros caracteres útiles que ayuden a dilucidar y solucionar este reto taxonómico. En este sentido, se ha encontrado que los caracteres reproductivos pueden contribuir en resolver este problema. Atendiendo esto, Wilce (1972), sugirió los patrones de ornamentación de las esporas, para la segregación de los géneros en la familia y son de vigencia en la actualidad. Más adelante,

Øllgaard (1975) determinó que los engrosamientos característicos propios de las paredes de los esporangios tienen utilidad taxonómica. Rolleri & Deferrari (1986) encontraron que los modelos epidérmicos no son influenciados por los factores ambientales y por consiguiente útiles en la delimitación taxonómica; esta misma autora comparó especies de *Huperzia saurura* (Lam.) Trevis. “gondwánica” encontrando poco o nada de variación en esta característica (Comunicación personal). Brown & Lemmon (1990) describieron las características de la esporogénesis en Bryophyta, indicando la importancia que tienen estas en la interpretación de la biología reproductiva y la evolución de estas plantas. Tryon & Lugardon (1991) elaboraron un atlas de la ultraestructura de las esporas de Pteridophyta incluidas varias especies de *Huperzia*, destacando la importancia de la microornamentación de las esporas. De la misma manera, Renzaglia *et al.* (2000) y Grauvogel-Stamm & Lugardon (2009), en sus trabajos argumentan la importancia de conocer las estructuras reproductivas de las criptógamas sin haces vasculares y con haces vasculares, en la interpretación de la historia evolutiva de estos grupos de plantas.

Dados estos antecedentes, es claro, la importancia de trabajos dedicados a la descripción de las estructuras reproductivas de los licopodios, siendo estos el grupo más basal de las plantas vasculares y sobre los cuales es poco o nada lo que se conoce sobre su biología reproductiva (Uehara & Kurita 1991, Rincón *et al.* 2009, Rolleri *et al.* 2010)

2. JUSTIFICACION

Las licopodiáceas han sido estudiadas en diferentes aspectos, pero pocos son los trabajos sobre los aspectos relacionados con la esporogénesis la mayor parte de los trabajos se circunscriben en la descripción del desarrollo de la fase sexual. En este sentido el presente estudio contribuirá al conocimiento de la biología reproductiva de las licopodiáceas en Colombia; ya que este es uno de los países que cuenta con una gran diversidad de licopodiáceas (Murillo & Murillo 1999).

Comprender la biología reproductiva de las licopodiáceas es de gran importancia ya que esta información se podría emplear en políticas de conservación y/o restauración, dada la gran acogida en la producción comercial y en el uso etnofarmacológico, para obtener alcaloides que exhiben una importante actividad farmacológica. Recientes estudios han demostrado la eficacia que tienen estos a la hora de manejar los síntomas de algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Xu *et al.* 1999, Wu & Gu 2006, Ma & Gan 2008) y la enfermedad de Parkinson (Houghton & Howes 2005), también han determinado las propiedades curativas que se encuentran en los alcaloides obtenidos de *Huperzia serrata*, huperzina A (HupA); en la medicina tradicional son empleados para mejorar la memoria (Xu *et al.* 1999, Ortega *et al.* 2004, Vallejo *et al.* 2007). Así mismo, estos alcaloides se han empleado para el tratamiento de contusiones, esguinces, inflamaciones, la esquizofrenia, la miastenia gravis y el envenenamiento por organofosforados (Ma *et al.* 2007).

La eficacia de los alcaloides obtenidos de *Huperzia* en el tratamiento de las enfermedades permitirá mejorar la salud de las personas, pero podría traer consigo un fuerte impacto sobre la diversidad de los licopodios por la sobreexplotación, pues no se cuenta con protocolos de cultivo y poco se ha incursionado en la propagación *in vitro* (Ma *et al.* 2006, Goodger *et al.* 2008) como fuente alternativa de materia prima para las industrias sin afectar los ambientes en donde se albergan estos grupos de plantas.

Por lo anterior, el estudio de la ontogenia y esporogénesis de *H. phyllicifolia* (Lycopodiaceae) mediante técnicas como la Microscopía Fotónica de Alta Resolución y pruebas histoquímicas son de gran importancia pues permiten aportar información sobre la biología reproductiva.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Describir las características estructurales de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *Huperzia phylicifolia*.

3.2 ESPECIFICOS

Describir a nivel de microscopia fotónica de alta resolución la ontogenia del esporangio y el proceso de esporogénesis de *H. phylicifolia*.

Realizar análisis morfométrico de las estructuras presentes en la esporogénesis de *H. phylicifolia*.

Comparar las características estructurales e histoquímicas de la esporogénesis y del proceso de ontogenia de *H. phylicifolia* con otros grupos de Licopodiáceas.

4. MARCO TEORICO

Los pteridofitos constituyen un grupo vegetal muy diversificado y distribuido geográficamente, incluyendo una riqueza de aproximadamente 12000 especies (Moran 2008). Recientes estudios filogenéticos basados tanto en datos morfológicos como moleculares sugieren que los pteridofitos se dividen en dos grupos: Lycophyta, que es considerado como un grupo monofilético que dominó la flora terrestre durante el periodo carbonífero, agrupa: Isoetes, Selaginelas y Licopodios y Euphylofitos, que a su vez comprende dos subtipos principales: las espermatófitos (plantas con semilla) y monilofitos (helechos) incluidos las colas de caballo y todos los helechos eusporangiados y leptoesporangiados (Smith *et al.* 2006, Judd *et al.* 2007) de esta forma, los licófitos representarían el grupo basal de las plantas vasculares (Raubeson & Jansen 1992) y “Pteridophyta”, que incluía a helechos y grupos afines se convierte en una categoría taxonómica no natural.

Los monilófitos y licófitos son importantes componentes de la flora vascular del planeta (Moran 2008) ampliamente distribuidas en todo el mundo, pero con la mayor diversidad en las regiones tropicales y a altitudes entre los 1500 y 2500 m (Tryon & Tryon 1982). En América se registran aproximadamente 3500 especies (Tryon & Tryon 1982) y en Colombia cerca de 1300 distribuidas en todo el país, con el mayor número de especies en la región Andina (Murillo & Harker 1990).

Del número total de especies estimadas de monilófitos y licófitos cerca de 380 especies corresponden a licófitos homosporados y en el neotrópico se encuentran alrededor de 190 especies (Moran 2008) de las cuales *Huperzia* es el género con mayor riqueza, con aproximadamente 150 representantes (Øllgaard 1992). En Colombia se han registrado 57 especies (Murillo & Murillo 1999), lo cual representa el 27% de las especies neotropicales; sin embargo, estos autores consideran que el número de especies para Colombia podría ser de 78 pues indican que en la literatura se citan 23 especies adicionales, que no fue posible incluir en su trabajo por la falta de material de referencia. Con lo cual, Colombia contaría con el 39 % de las especies neotropicales, colocándola en el primer puesto de diversidad por encima de Ecuador (77 especies) y Perú (63 especies).

La riqueza de este componente florístico en Colombia es importante (Rangel 2000) y más cuando se considera a los páramos de los Andes como centros de endemismo de estas especies (Øllgaard 1987, 1996); y de los cuales nuestro país

cuenta con las mayores extensiones en el mundo (Rangel 2000, Mena & Hofstede 2006).

Las Lycopodiaceae se agrupan actualmente en cuatro géneros: *Huperzia*, *Lycopodiella*, *Lycopodium* y *Phylloglossum*, esta última crece en el sur-este de Australia, Nueva Zelanda y Tasmania (Øllgaard 1987). La familia está ampliamente distribuida en toda Colombia pero la mayor concentración de especies se encuentra en la región Andina, en las cordilleras Oriental y central (Murillo & Murillo 1999). *H. phyllicifolia* crece desde Costa Rica hasta Bolivia; esta especie es semejante a *Huperzia subulata* Holub y se han separado básicamente por el tamaño de la hojas; no obstante Murillo & Murrillo (1999) en su estudio no encontraron caracteres que permitan separar estos taxones. En Colombia *H. phyllicifolia* se encuentra en la región Andina y en las cordilleras Central y Occidental desde Antioquia hasta Nariño en alturas comprendidas entre 2850 y 3650m (Murillo & Murillo 1999). En el departamento del Cauca se encuentran registros para los municipios de Puracé, San Sebastián y Silvia (Ramírez & Macías 2007).

Entender a profundidad la estructura de los procesos de ontogenia y esporogénesis en licopodios es importante y para ello se hace necesaria la aplicación de algunas técnicas una de estas es la microscopía fotónica de alta resolución método histotecnológico mediante el cual se obtienen cortes de tejido a partir de muestras incluidas en parafina y con las cuales se aprovecha al máximo el poder del microscopio de luz y se perfecciona la observación de detalles morfológicos (Caldas *et al.* 1995, Ruzin 1999, Haseloff 2003) que ayudarán a entender la estructura proceso de ontogenia y esporogenesis de *H. phyllicifolia*

Por otra parte, la aplicación de técnicas histoquímicas que permiten identificar sustancias o compuestos en particular presentes en un tejido vegetal, hecho que ayudará a especular el momento fisiológico por el cual está atravesando alguna estructura en particular (Bruce 1976, Smith & McCully 1978, Takahashi 1988, Ibars *et al.* 1988, Domínguez *et al.* 1999, Long 2003, Tofiño *et. al* 2006, Ghanem *et al.* 2010) y así conjeturar sobre la posible función dentro del proceso de la esporogénesis y ontogenia. Entre estas tenemos, la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS) que revela todo tipo de carbohidratos (polisacáridos, como el glucógeno, mucopolisacáridos, glucolípidos, glicoproteínas etc.), azul de alcian, que es un colorante que determina la presencia de mucopolisacáridos sulfatados, medianamente sulfatados o fuertemente sulfatados dependiendo del pH al cual se prepare la solución (Ruzin 1999, Haseloff 2003). También la coloración de azul de

anilina que permite observar junto a la microscopía de fluorescencia utilizando radiación UV (Filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm) la presencia de calosa; de esta manera se determina si la pared de las esporas se desarrolla en ausencia de calosa como en los Anthoceros y otros briofitos, puesto que esta situación no sea documentado en licófitos (Brown & Lemmon 1990, Long 2003). La calosa es un compuesto importante durante la microscopogénesis (Takahashi 1986, Takahashi 1988, Meier-Melikyan *et al.* 2003, Teng *et al.* 2005, Anger & Weber 2006, Blackmore 2007, Blackmore *et al.* 2007) (formación de granos de polen) y al parecer se relaciona con la formación de la exina, situación descrita por Brown & Lemmon (1990) para algunas Hepáticas, helechos y plantas vasculares.

Por ultimo las coloraciones de lugol y sudan III para identificar la presencia de almidón y lípidos; posibles precursores en el proceso de formación de la pared de las esporas y sustancias de reserva. Todo esto nos ayudará a comprender el proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia*, aportar este conocimiento de la biología reproductiva de esta planta con lo cual se podría implementar estrategias de conservación ya que este es un componente importante dentro de toda la flora de nuestro país.

5. ANTECEDENTES

Los estudios en licopodiáceas son diversos, desde carácter taxonómico como sistemático como los de Rolleri (1972a-b, 1974, 1975, 1976, 1977a-b, 1979, 1980, 1981) que inició los análisis de anatomía foliar en el grupo, y utilizó caracteres morfológicos tales como la distribución de las papilas epidérmicas marginales y superficiales, los modelos epidérmicos, la distribución de los estomas, la estructura de los márgenes de los micrófilos y los modelos epidérmicos de la pared esporangial para distinguir especies o grupos de especies. Øllgaard (1975) realizó una revisión de la epidermis de los esporangios en Lycopodiaceae y definió modelos epidérmicos en los géneros, Bruce (1976) identificó los canales de mucílago de los micrófilos de *Lycopodiella* y *Lycopodium* distinguiendo dos tipos: el canal venal o nerval, que se encuentra tanto en esporófilos como en las hojas vegetativas. Finalmente Wilce (1972) y Tryon y Lugardon (1991) propusieron modelos de ornamentación de pared de las esporas en los géneros: foveolada, fusulada, foveolada/fusulada en *Huperzia* y *Phylloglossum*, rugulada en *Lycopodiella* y reticulada en *Lycopodium*.

Otros estudios que aportan a la sistemática aplicando pruebas más específicas a nivel molecular son los descritos por Smith *et al.* (2006) proponen nuevas hipótesis filogenéticas basadas en datos de factores morfológicos y moleculares. Ma *et al.* (1998) analizan las relaciones taxonómicas entre géneros de Lycopodiales valiéndose de la presencia de alcaloides en *Lycopodium*. Wolf *et al.* (2005) secuencian el primer genoma completo del cloroplasto de una *Huperzia* permitiendo ratificar su hermandad con las plantas vasculares; y por último Guo Ji *et al.* (2008) mediante técnicas moleculares como la amplificación por PCR de una secuencia de genes estudiaron las relaciones filogenéticas e hicieron una identificación molecular de algunas especies de *Huperzia*.

Por otra parte, hay numerosos aportes de carácter anatómico, florístico, monográfico, como los de Hackney (1950) Tardieu-Blot (1971), Toursarkissian (1971), Rolleri & Deferrari (1989), Øllgaard (1987, 1988, 1992, 1996), Tryon & Stolze (1994), Tejero & Arreguín (2004), Rodríguez *et al.* (2004), Izco *et al.* (2007). morfológicos, como los de Rolleri & de la Sota (1972), Rolleri & Deferrari (1986), hasta citológicos, como los de Rolleri (1982 a-b), entre otros.

Para Colombia, los trabajos más destacados son el de Santa (1986) quien describió la anatomía de los tallos de licopodios y determinó la importancia de este aspecto en la delimitación de los géneros *Huperzia*, *Lycopodiella* y *Lycopodium*. Santa (1989) afirma que la familia Lycopodiaceae está representada por 39 especies andinas y posteriormente Murillo & Harker (1990) en un estudio más extenso citan 57 especies, algunos trabajos más recientes enfocados al conocimiento de la flora pteridológica en diferentes zonas del país como los de Murillo & Murillo (1999), Moreno & Murillo (2000), Ramírez & Macías (2007) y Sanín *et al.* (2008), estudios palinológicos como lo de Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005) y Duarte *et al.* (2006). Y Rincón *et al.* (2009) presentan datos originales sobre la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *H. brevifolia*.

Algunos estudios en cuanto a la biología reproductiva demuestran que son importantes los estudios estructurales de procesos reproductivos a nivel microscópico, entre ellos tenemos el expuesto por Sikes (1908) quien dio a conocer las primeras descripciones sobre la estructura y organización de los esporangios en licopodiáceas; Wilce (1972) describió las esporas de *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Huperzia*, proponiendo grupos sobre la base de la ornamentación; Øllgaard (1975) y Rolleri (1979) estudiaron la estructura y el modelo epidérmico de la pared del esporangio de especies incluidas hasta ese momento en *Lycopodium*, resaltando la importancia de estos caracteres en la sistemática. Uehara & Kurita (1991), elaboraron el único estudio sobre la morfogénesis y ultraestructura de la pared de las esporas de licopodiáceas, tomando como modelo *L. clavatum* e incluyendo algunos aspectos relacionados con la formación de las esporas. Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005), describieron detalladamente las esporas de 24 especies de *Huperzia*, incluida *H. brevifolia*, Pita *et al.* (2006) describieron la morfología interna y externa de los micrófilos y esporangios de 10 especies de *Huperzia* de Brasil, un trabajo amplio sobre aspectos anatómicos del género, Rincón *et al.* (2009) presentan datos originales sobre el desarrollo del esporangio y esporogénesis de *H. brevifolia*, muestran con la ayuda de técnicas como la microscopía fotodocumentación muy clara donde describen el proceso de formación de las esporas y todas las estructuras que intervienen en el mismo. Finalmente, Rolleri *et al.* (2010) describieron las esporas y los rasgos de la pared esporangial de *Huperzia reflexa* y *Lycopodiella cernua* en el contexto de un estudio morfológico de estas dos especies del noroeste de Argentina.

Las licopodiáceas han sido estudiadas en diferentes aspectos sin embargo en lo referente a la biología reproductiva lo reportado en la literatura es escaso y más aún si se tiene en cuenta que las licopodiáceas tienen una amplia distribución y

más en lo que se refiere a *Huperzia*, este género tiene muchas especies que todavía no se han estudiado y su desconocimiento hace que no se tengan en cuenta en estudios de diversidad de lycopodiáceas presentes en toda la zona de los andes de Colombia.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 AREA DE ESTUDIO

Los ejemplares de *H. phyllifolia* fueron recolectados en localidades del municipio de Puracé-Coconuco (Cauca-Colombia) (Fig. 1), en el mes de Marzo la cual corresponde a época de lluvia a 3376m de altitud (02° 22' 300" N, 076° 22' 306" W). El material de soporte de este trabajo fue incluido en el Herbario de la Universidad del Cauca (CAUP) Popayán. Registro: Puracé–Coconuco, a orilla de carretera, 3376 m, 5 de marzo 2011, J.M. Dorado 9 (CAUP).



Figura 1. Ubicación de la zona de recolecta. Fuente: Google Earth. El icono en amarillo representa la zona de recolecta

6.2 Descripción de la ontogenia del esporangio y el proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia*.

Se tomaron 30 estróbilos maduros, para luego fijarlos en FAA (Formol-alcohol-ácido acético) por 24-48 horas a 4°C; posteriormente, el material fijado se deshidrató en la serie clásica de alcoholes y se aclaró en dos pasos por xilol (Ruzin 1999). Luego de este tratamiento se cortaron fragmentos de 1cm de longitud para ser embebidos en Paraplast (Mc Cormick®) durante 12 horas a 55°C; una vez incluidas, las muestras fueron seccionadas a 3-5 μm con micrótopo rotatorio 820 Spencer. Para la observación de los tejidos, determinación de mucopolisacáridos, lípidos, almidón y presencia de calosa, las secciones obtenidas fueron coloreadas con safranina-fast green, reacción de ácido periódico de Schiff (PAS), azul de alcian, Sudan III, Lugol y azul de anilina respectivamente (Johansen 1940, Ruzin 1999). Con el fin de describir detalles que se puedan perder con el procesamiento de las muestras y hacer mayor énfasis en el proceso de meiosis, también se hicieron preparados en fresco por aplastamiento de los esporangios en diferentes etapas de maduración y coloreados con acetorceína láctica para la observación de los eventos de división celular.

Los montajes se examinaron con un microscopio fotónico de alta resolución Nikon 80i eclipse, equipado con DIC (contraste diferencial de interferencia) y un microscopio Nikon eclipse 200 equipado con fluorescencia utilizando radiación UV (Filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm). Las microfotografías de alta resolución y fluorescencia se obtuvieron con cámara digital Nikon DS-2MV. La fotodocumentación se realizó con el programa NIS Elements versión 3.07 de Nikon. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el programa Imagen-Pro Analyzer 6.3 de Media Cybernetics. Todo el procesamiento y observación del material se llevó a cabo en la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca.

Se tomaron medidas con $n= 30$ para cada estructura; se midió la longitud de las tétradas en posición radial y lateral, la longitud del eje ecuatorial de las esporas maduras, de los engrosamientos de las paredes anticlinales y periclinales de las células de la pared del esporangio, la medida del ancho y largo del pedicelo de esporangios maduros estas fueron representadas por la medida mínima, máxima, media y desviación estándar, utilizando el software Microsoft Excel 2007.

7. RESULTADOS

7.1 Descripción de la ontogenia del esporangio y el proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia*.

Las plantas son delgadas, colgantes de hasta 150 cm de largo (Fig. 2) son heterófilas es decir hay diferencia entre trofófilos y esporófilos; las hojas son de tipo micrófilo, presentan estróbilos de aproximadamente 2 cm a 18,5 cm de longitud, los esporangios se localizan en la base de los esporófilos y maduran de forma basípeta; ubicándose los inmaduros en el ápice del estróbilo, por lo general son de color verde y los adultos de color amarillo en la base (Fig. 3).

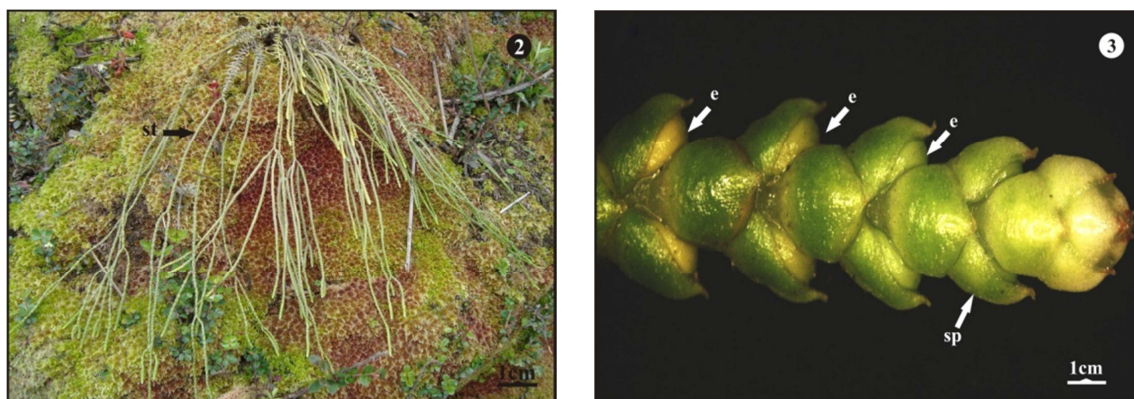


Figura 1-3.Vista de *Huperzia phyllicifolia*.**2.** Planta creciendo entre musgos en borde de barranco. **3.** Estróbilo maduro de *H. phyllicifolia*.e: esporangio, sp: esporofilo, st: estróbilo

El desarrollo de los esporangios inicia a partir de un grupo de células epidérmicas localizadas en la axila que los esporófilos forman con el eje del estróbilo (Fig. 4). Este grupo celular presenta divisiones periclinales y anticlinales estableciendo dos capas de células que se caracterizan por presentar formas (rectangulares a cuadradas), un núcleo voluminoso y posición central de citoplasma escaso (Fig.5). Por activas divisiones mitóticas estas células forman un agregado indiferenciado de células de aspecto juvenil, con granulación difusa, de núcleos grandes, varios nucléolos y citoplasma comparativamente escaso; en este agregado se constituyen dos grupos celulares: uno interno que formará el tejido esporógeno y uno externo que se diferenciará como pared del esporangio (Fig. 6). Una vez terminado el proceso de diferenciación de estos agregados celulares, el esporangio queda constituido por la pared esporangial, el tapete, que proviene del

estrato interno de la pared del esporangio y tejido esporógeno, que se divide activamente por mitosis (Fig. 7).

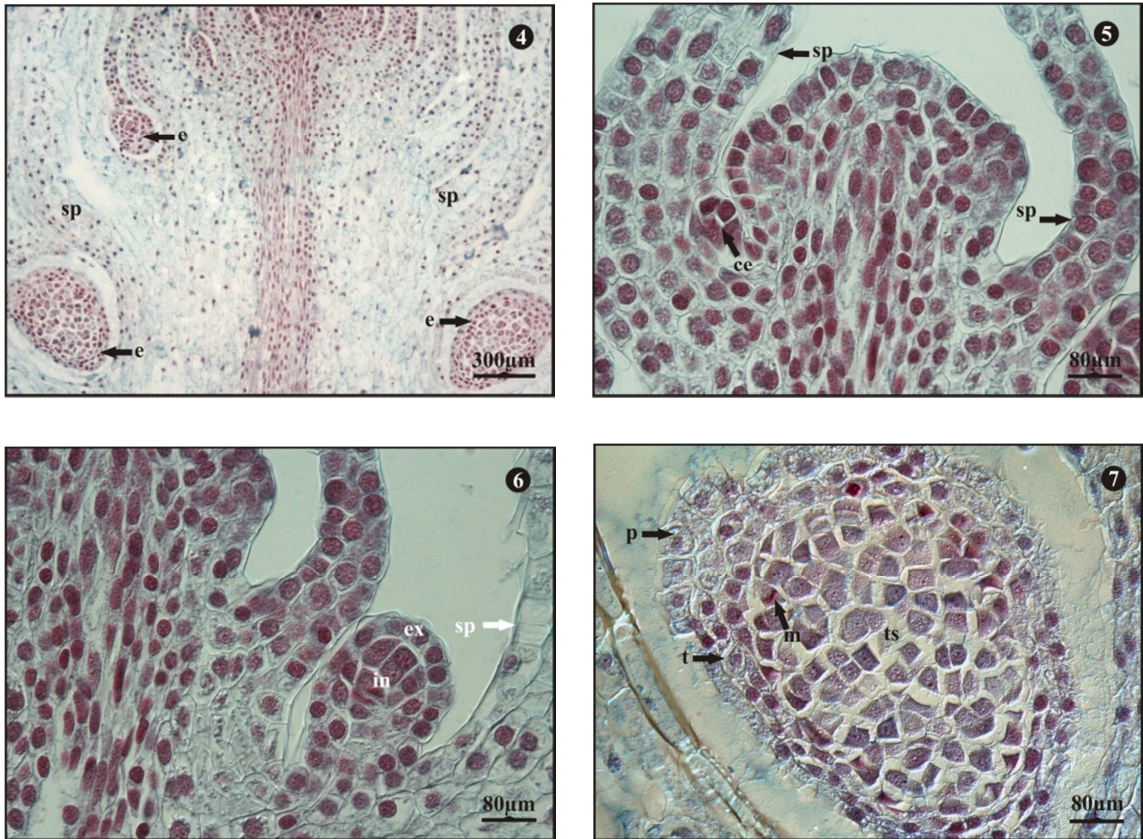
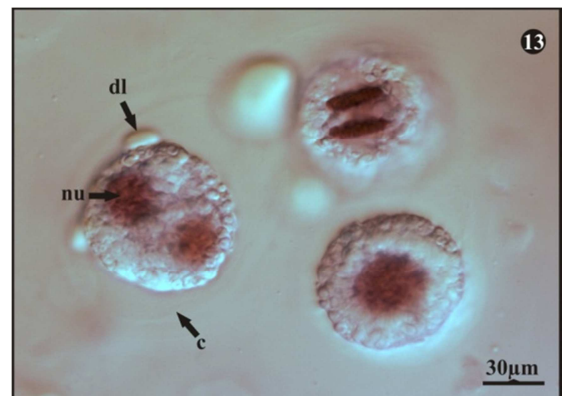
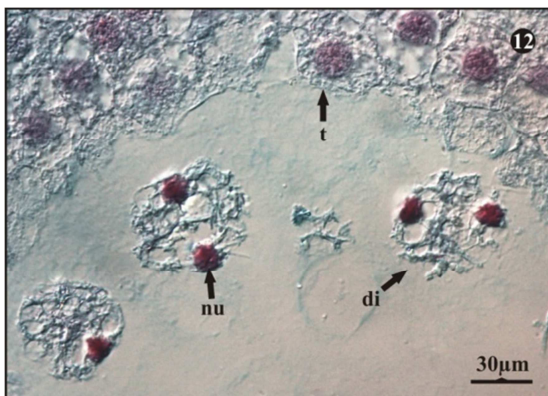
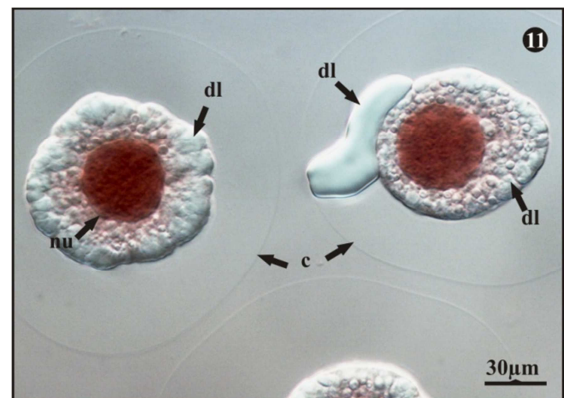
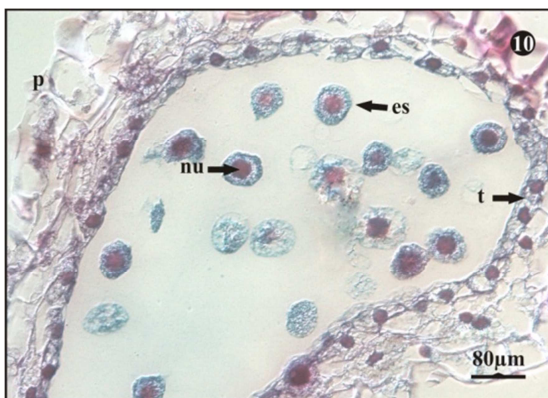
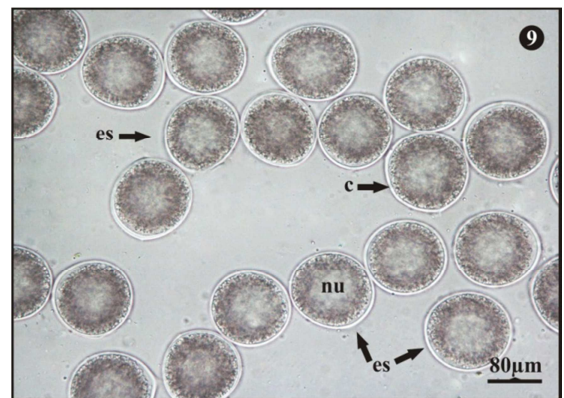
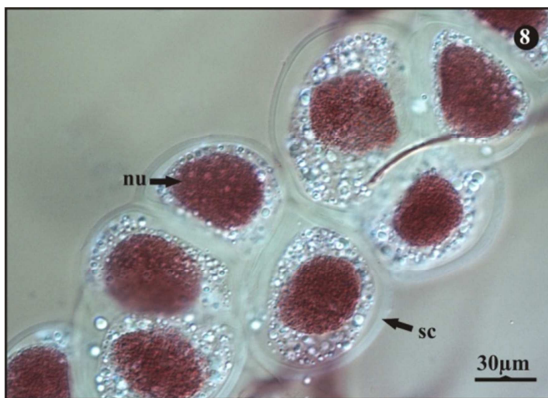


Figura. 4-7. Primeras etapas de la ontogenia del esporangio de *H. phyllicifolia*. Tinción con safranina- fast green. Cortes permanentes. **4.** Corte longitudinal de la región apical del estróbil. **5.** Células epidérmicas que dan origen al esporangio. **6.** Diferenciación del esporangio, con aumento en el número de células por activas mitosis. **7.** Esporangio diferenciado con pared y tejido esporógeno; se observa el aumento en el número de células por activas mitosis. ce: células epidérmicas, e: esporangio, ex: agregado externo, in: agregado interno, m: mitosis, p: pared del esporangio, sp: esporofilo, t: tapete, ts: tejido esporógeno.

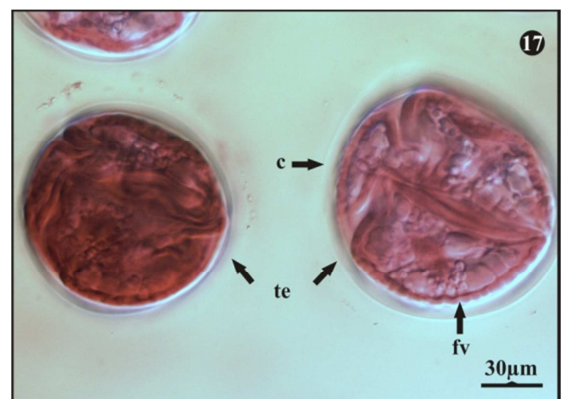
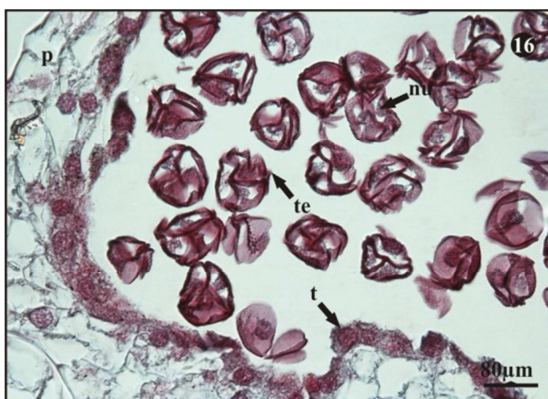
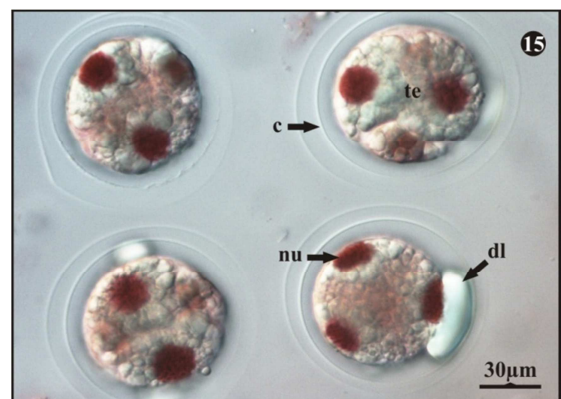
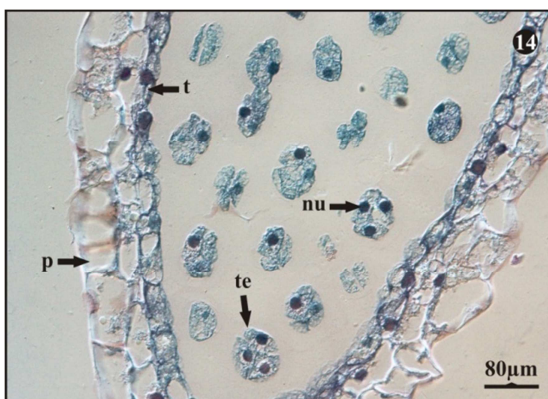
Las células del tejido esporógeno se encuentran densamente agrupados en el esporangio, presentan forma variable, contorno poligonal, núcleos grandes con varios nucléolos y citoplasma de aspecto granular (Fig. 7). El tejido esporógeno se diferenciará en los esporocitos (Fig. 8). El proceso inicia con la formación de grandes vacuolas en el citoplasma, el hinchamiento y separación de las células en la cavidad del esporangio, de esta forma adquieren forma redondeada, así mismo, la cubierta de los esporocitos se hace prominente y aumenta la cantidad de gránulos en el citoplasma, se separan en la cavidad del esporangio y en esta fase

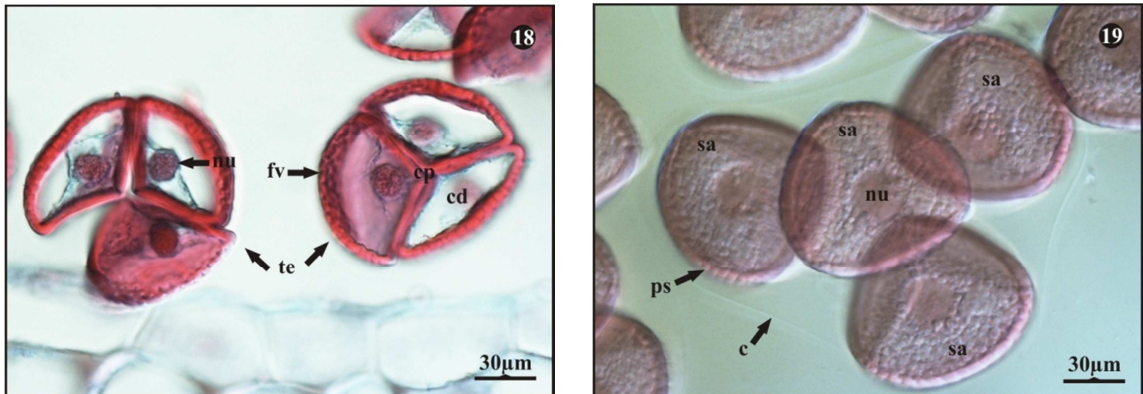
tienen un núcleo grande y en posición central (Fig. 9). En montajes permanentes se observa una situación similar, pero, los esporocitos premeióticos se aprecian sin cubierta. Estos se caracterizan por presentar células de núcleo en posición central y citoplasma fuertemente vacuolado (Fig. 10), en montajes en fresco para esta etapa se puede apreciar tanto la cubierta del esporocito como también depósitos de material lipídico entre el esporocito y la cubierta de este (Fig. 11) para este mismo momento, el tapete se ha diferenciado plenamente, así como, la pared definitiva del esporangio.



Figuras 8-13. *H. phyllicifolia*, esporocitos maduros y meiosis I. **8.** Esporocitos de *H. phyllicifolia* con la cubierta del esporocito (montaje fresco teñidos con acetorceína láctica) **9-10.** Esporocitos hinchados envueltos por su cubierta (Montaje en fresco sin colorear) y sin su cubierta (Montaje permanente coloreado con safranina- fast green) respectivamente. **11.** Esporocitos premeióticos hinchados y envueltos por su cubierta (montaje fresco coloreado con acetorceína láctica), se observa depósitos de material lipídico. **12.** Estado de diada al finalizar la meiosis I; se puede observar la ausencia de pared entre los núcleos (Montaje permanente coloreado con safranina-fast green). **13.** Estado de diada al finalizar la meiosis I, se puede observar depósitos de material lipídico (Montaje fresco coloreado con acetorceína láctica). c: cubierta esporocito, di: estado de diada, dl: depósito de material lipídico, es: esporocito, nu: núcleo, p: pared del esporangio, sc: futura cubierta del esporocito, t: tapete.

Posteriormente, los esporocitos entran en meiosis I, para formar la etapa de diada, en la cual no se aprecia pared celular que separe los núcleos (Fig. 12-13). Al finalizar la meiosis II, se forman las tétradas con esporas en posición tetraédrica donde se observan los núcleos de las esporas en formación; así mismo, el tapete se mantiene (Fig. 14-15). Estos procesos son similares tanto en montajes permanentes como en fresco a diferencia de que en este último se evidencia la presencia de la cubierta y depósitos de material lipídico los cuales en montajes permanentes no se aprecian por los solventes empleados en la preparación de las muestras (Fig.14-15).





Figuras 14-19. *H. phyllicifolia*, meiosis II y tétradas en diferentes etapas de maduración. Se observa el engrosamiento progresivo de las paredes de las esporas y el inicio de la formación del patrón de ornamentación **14**. Tétradas jóvenes con esporas en disposición tetraédrica (montaje permanente coloreado con safranina- fast green). **15**. Tétrada inmadura, se observa la cubierta del esporocito (Montaje fresco coloreado con acetorceína láctica). **16**. Esporangio con tétradas en maduración (Montaje permanente coloreado con safranina- fast green) se aprecia el tapete y la pared del esporangio. **17-18**. Tétrada maduras. Se destaca más el patrón de ornamentación y la cubierta del esporocito en Fig.17 (Montaje fresco coloreado con acetorceína láctica). **19**. Separación de las esporas en la tétrada. Aún persiste la cubierta del esporocito (Montaje fresco coloreado con acetorceína láctica). c: cubierta esporocito, cd: cara distal, cp: cara proximal, dl: depósito de material lipídico, fv: foveola, nu: núcleo, p: pared del esporangio, sa: espora, ps:pared de la espora, t: tapete, te: tétrada.

Las tétradas de *H. phyllicifolia* pasan por varias etapas de maduración, que se relacionan con el engrosamiento progresivo de las paredes de las esporas y con el surgimiento del patrón de ornamentación foveolada en la cara distal de las mismas (Fig. 16-18). Subsiguientemente, la cubierta de los esporocitos se rompe y las esporas son liberadas a la cavidad esporangial (Fig. 19). El tapete se diferencia durante la formación de los esporocitos, se mantiene durante la mayor parte de la esporogénesis y degenera en el momento de la maduración de las esporas (Fig. 20). Con la maduración del esporangio, las capas internas de la pared del esporangio degeneran y solo persisten y se ha diferenciado el estrato celular externo, que adquieren engrosamientos en las paredes anticlinales y periclinales internas, estableciéndose la pared definitiva del esporangio (Fig.20). Finalmente, las esporas maduras son liberadas en la cavidad del esporangio, estas, se caracterizan por presentar lesura trirrasgada y patrón de ornamentación foveolada en la cara distal y silado en la cara proximal en la cual se localiza la lesura trirrasgada (Fig.21). Los esporangios maduros son isovalvados. En ninguna etapa del desarrollo se observó tejido vascular, ni células de transfusión asociadas a los esporangios.

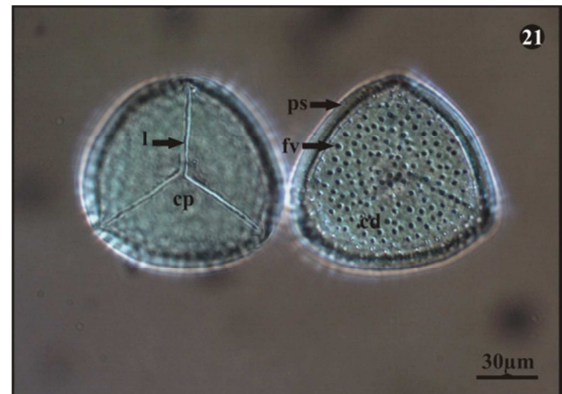
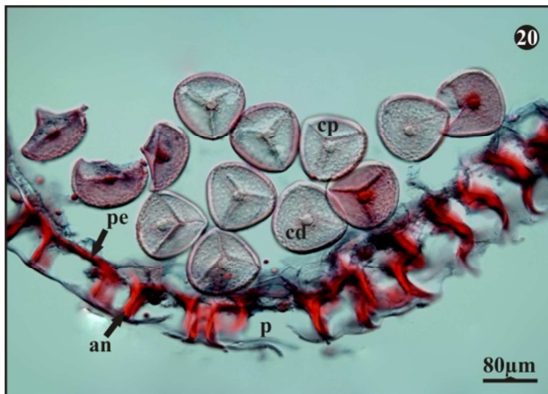


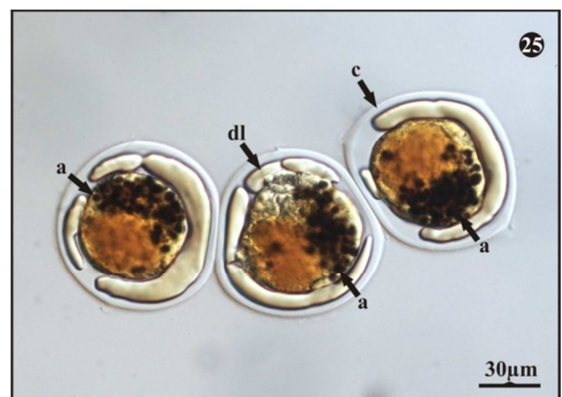
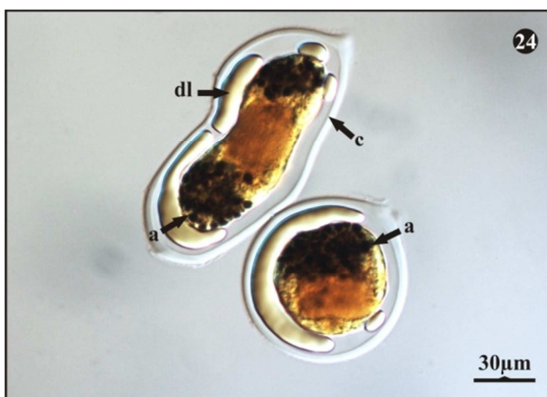
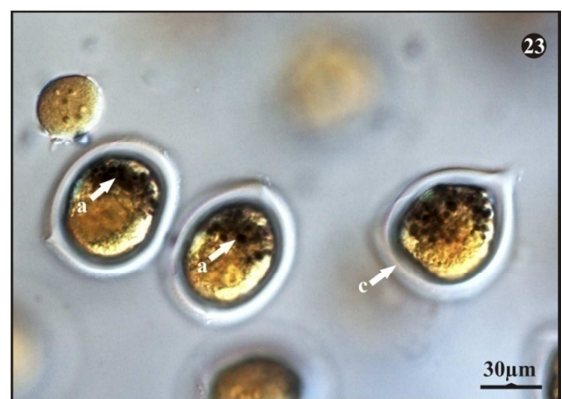
Figura. 20-21. Esporas maduras y células de la pared del esporangio de *H. phyllicifolia* **20.** Esporas en vista proximal con la superficie silada y engrosamientos de las paredes anticlinales y periclinal interna del esporangio (Montaje permanente coloreado con safranina- fast green). **21.** Esporas en vista distal y proximal con ornamentación foveolada y silada respectivamente. Se observa la lesura trirrsgada en la cara proximal de la spora. (Montaje fresco coloreado con acetorceína lactica). an: engrosamiento anticlinal, cd: cara distal, cp: cara proximal, fv: foveola, l: lesura trirrsgada, p: pared del esporangio, pe: engrosamiento periclinal, ps: pared de la spora.

En montajes en fresco y coloreados con acetorceína láctica se pudo corroborar y ampliar las descripciones que se hicieron con el material procesado y cortado. Una de ellas es la presencia de la cubierta de los esporocitos la cual se mantiene durante todo el proceso de diferenciación del tejido esporógeno y la meiosis; está cubierta solo se pierde en el momento de la liberación de las esporas en la cavidad del esporangio detalle que se pierde en preparaciones microscópicas permanentes, pues si bien es cierto este proceso nos permitió describir el proceso de diferenciación de esporangios y esporogénesis el aporte más importante fue observar la organización espacio temporal de estos procesos. También se observó la acumulación de compuestos que más adelante con pruebas como el lugol y sudan III se comprobó que son almidón y depósitos de material lipídico.

7.2. Pruebas histoquímicas

7.2.1. Identificación de almidón durante el proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia*.

La prueba del lugol es una colorimétrica para detectar almidones. Durante el proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia* demuestra la presencia de este compuesto desde momentos tempranos del desarrollo del esporangio en las células del tejido esporógeno, aunque en poca concentración (Fig. 22). Con el desarrollo y maduración del esporangio la cantidad de esta biomolécula se acumula a medida que las células del tejido esporógeno se diferencian en esporocitos (Fig. 23-24), y alcanzan un máximo de acumulación en los esporocitos premeióticos (Fig. 25-26). Al finalizar la meiosis se aprecia acumulación de esta sustancia en las tétradas inmaduras (Fig. 27); En contraste, en tétradas maduras y las esporas no se detecta la acumulación de estos gránulos (Fig. 28-29). Además en estos preparados se observaron otros materiales de naturaleza refringente, posiblemente lípidos, presentes en el citoplasma de las células y el espacio entre la cubierta del esporocito y el esporocito que no reaccionaron con el lugol.



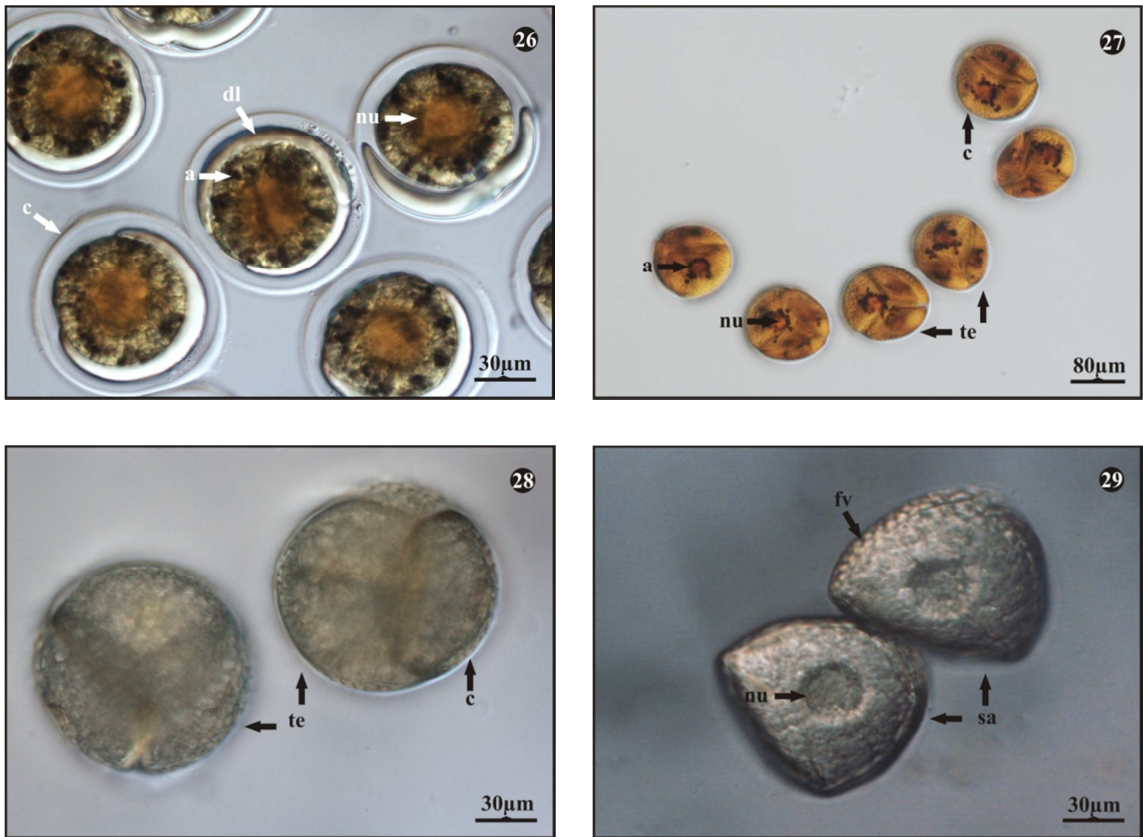
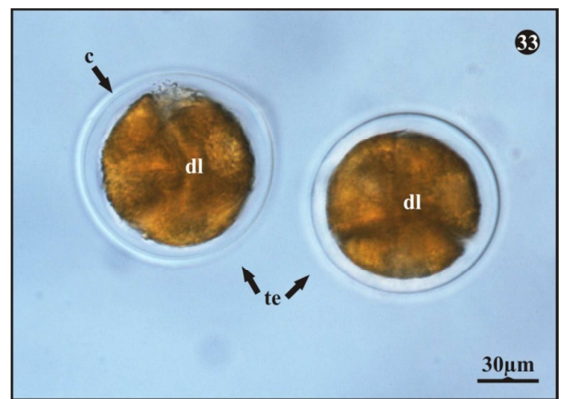
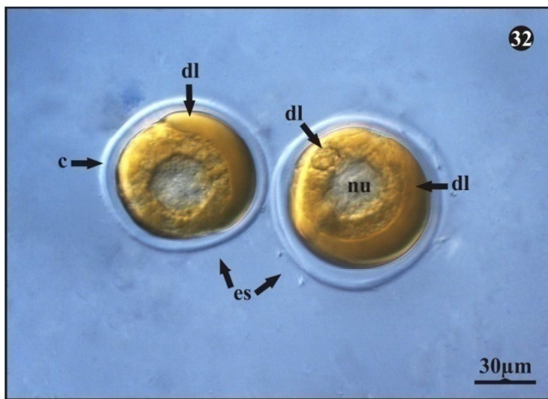
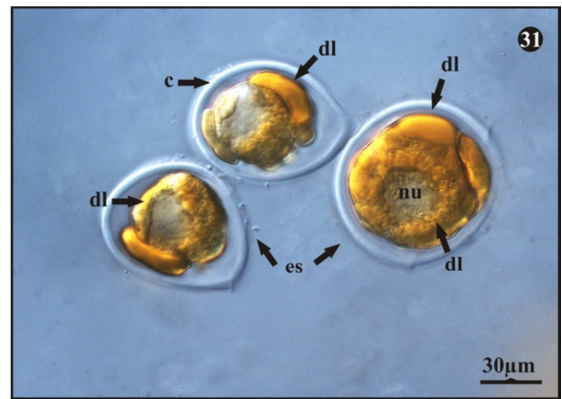
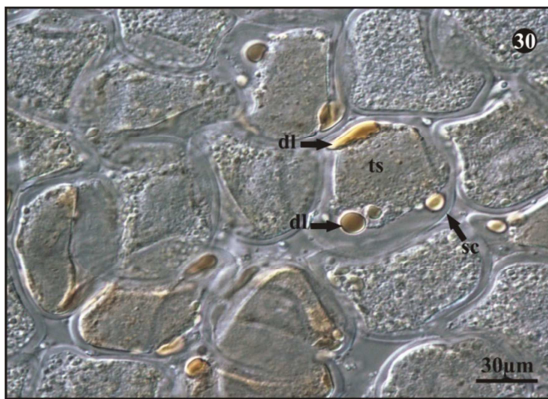


Figura. 22-29. Tejido esporógeno, esporocitos, tétradas y esporas de *H. phyllicifolia* coloreadas con lugol (montajes de material en fresco) **22.** Células del tejido esporógeno. **23-26.** Esporocitos en diferentes momentos de maduración donde se aprecia gránulos de almidón en negro. **27.** Tétrada inmadura con gránulos de almidón de *H. phyllicifolia*. **28-29.** Tétradas maduras y esporas sin gránulos de almidón visibles de *H. phyllicifolia*. a: gránulos de almidón, c: cubierta del esporocito, dl: depósito de material lipídico, fv: foveola, nu: núcleo, sa: espora, sc: futura cubierta del esporocito te: tétradas, ts: tejido esporógeno.

7.2.2. Identificación de materiales lipídicos durante el proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia*

El material refringente que se observó durante la aplicación de la prueba de lugol, presente en el citoplasma de las células y el espacio entre la cubierta del esporocito y el esporocito, fue positivo para sudan III, con lo cual se evidencia su naturaleza lipídica (Fig. 30-35). Durante el proceso de esporogénesis se observa acumulación de estos lípidos, se empiezan a acumular desde el momento de la formación del tejido esporógeno, entre estas células y la futura cubierta del esporocito que las recubre (Fig. 30). Este material se encuentra inicialmente como pequeños depósitos de material refringente que posteriormente se fusionan

formando una capa casi continua entre el esporocito y la cubierta del esporocito, así mismo, se aprecian depósitos globulares de este material en el citoplasma (Fig.31-32). Una vez iniciada la meiosis el material lipídico se internaliza entre las esporas en formación (Fig. 33). Posteriormente, cuando el esporodermo se ha formado totalmente en las tétradas de esporas, este material solo se encuentra al interior del citoplasma formando grandes masas globulares que ocupan la mayor parte del citoplasma (Fig. 34). Por último, en las esporas maduras se observan gran cantidad de estos depósitos de forma globular más pequeños que los observados en las tétradas y ocupan la mayor parte del citoplasma de las esporas rodeando el núcleo (Fig. 35).



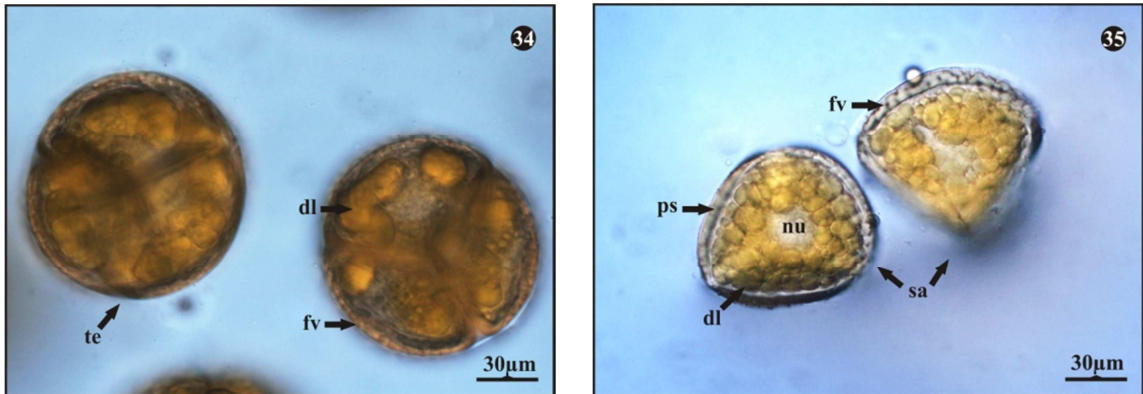


Figura. 30-35. Tejido esporógeno, esporocitos, tétradas y esporas de *H. phyllicifolia* coloreados con Sudan III. **30.** Tejido esporógeno con depósitos de material lipídico. **31-32.** Esporocitos en diferentes momentos de maduración. **33.** Tétradas inmaduras con depósitos lipídicos entre las esporas. **34.** Tétradas maduras. Se aprecian depósitos de lípidos en el citoplasma de las esporas. **35.** Esporas maduras. Los depósitos lipídicos son prominentes al interior del citoplasma. c: cubierta del esporocito, dl: depósitos de material lipídico, es: esporocito, fv: foveola, nu: núcleo, ps: pared de la espora, sa: esporas, sc: futura cubierta del esporocito, te: tétradas, ts: tejido esporógeno.

7.2.3. Identificación de mucopolisacaridos con la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS), contrastado con Hematoxilina de Harris.

Las pruebas con la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS), contrastado con Hematoxilina de Harris evidenció la presencia de mucopolisacáridos en las diferentes etapas y estructuras implicadas en el proceso de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *H. phyllicifolia*. Durante las primeras etapas de la diferenciación de los esporangios se evidencia la presencia de mucopolisacáridos en la pared interna de las células del tapete, así como en el citoplasma del tejido esporógeno (Fig. 36-37). Estos mucopolisacáridos también se observaron en el citoplasma de los esporocitos premeioticos y no se detectaron en la cavidad esporangial (Fig. 38). Así mismo, sobre la pared de las esporas en formación también es PAS Positiva (Fig. 39); sin embargo, a medida que estas maduran la coloración disminuye progresivamente (fig. 40-41). Es de aclarar que la prueba de ácido periódico de Schiff (PAS) detecta todo tipo de mucopolisacáridos, además de celulosa y lignina, por tal razón, se debe tener cuidado en la interpretación de los resultados.

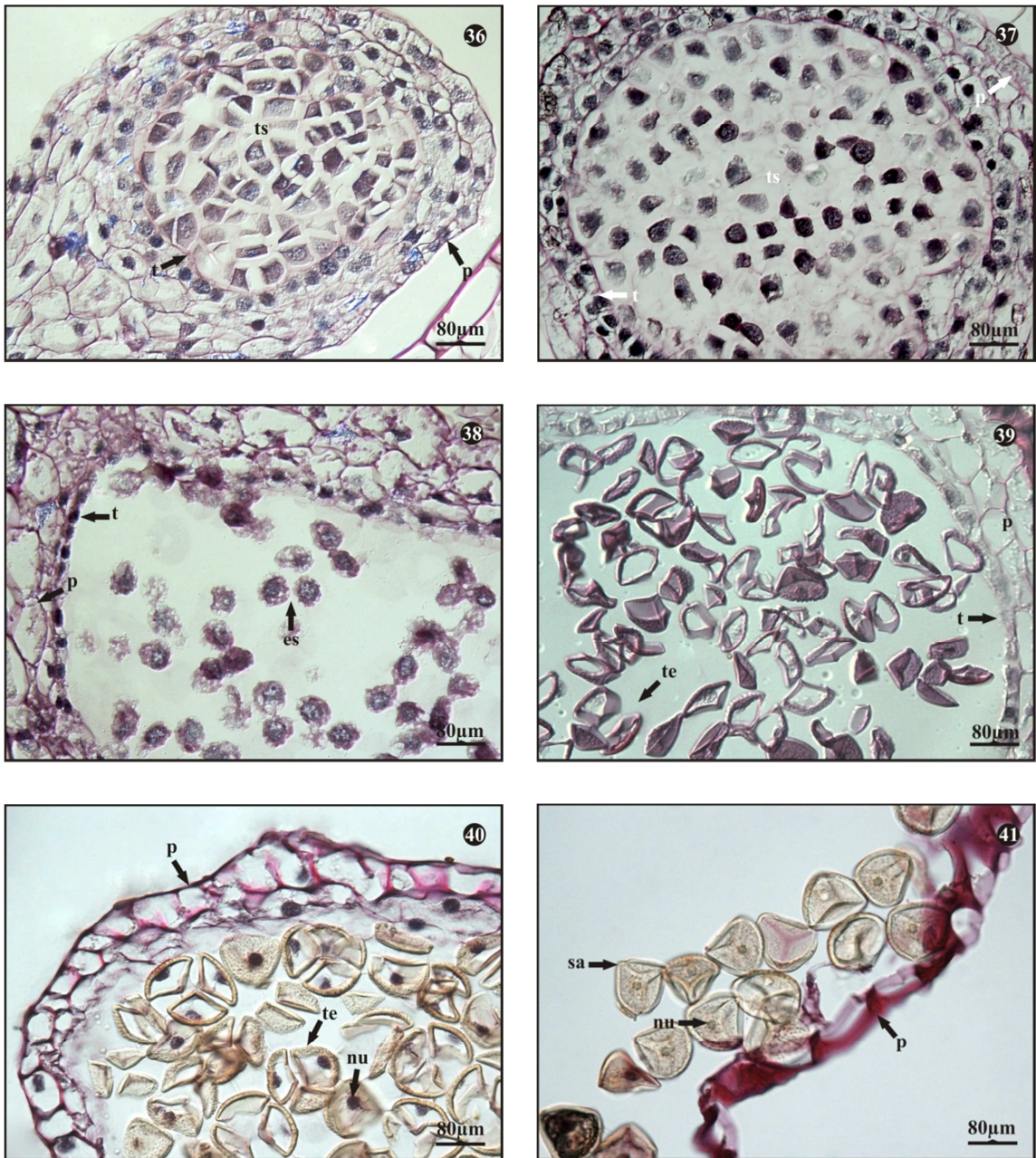
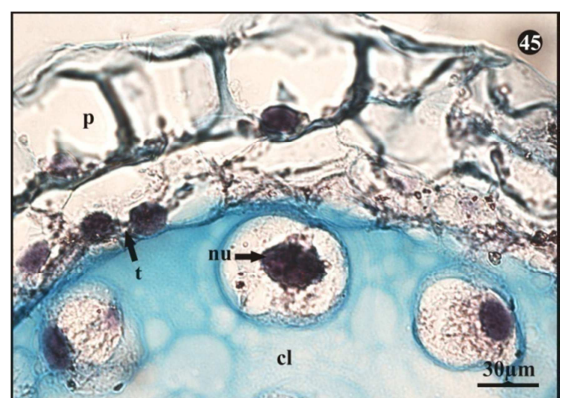
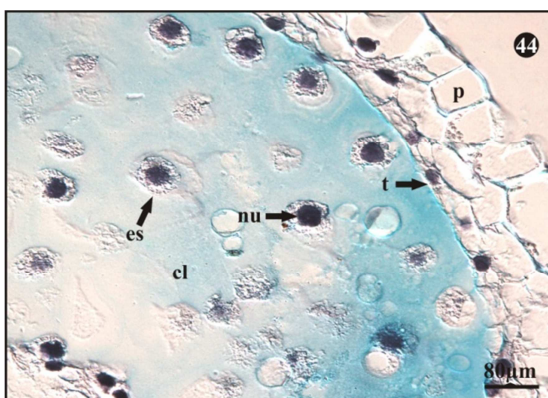
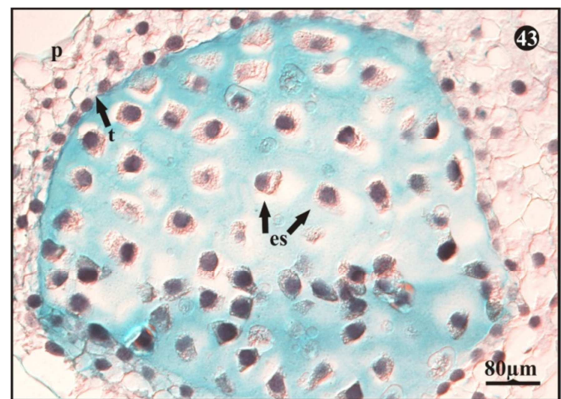
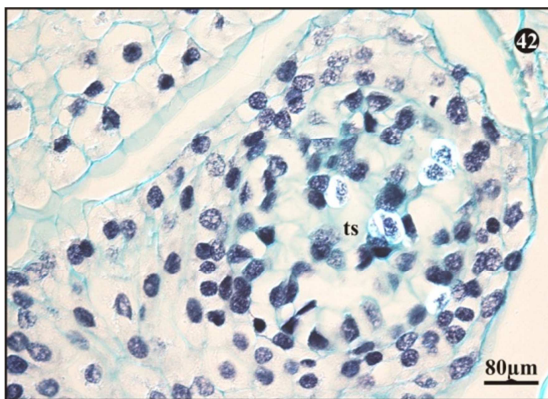


Figura. 36-41. Identificación de mucopolisacáridos durante la esporogénesis de *H. phlyicifolia* utilizando la tinción de PAS. **36-37.** Tejido esporógeno. **38.** Esporocitos, obsérvese el citoplasma PAS positivo. **39.** Tétradas inmaduras. La coloración de PAS es evidente en el esporodermo en formación. **40-41.** Tétradas maduras y esporas. Como se aprecia la coloración de PAS se hace menos evidente a medida que se maduran las esporas. es: esporocito, nu: núcleo, p: pared del esporangio, sa: esporas, t: tapete, te: tétradas, ts: tejido esporógeno.

7.2.4. Identificación de mucopolisacáridos sulfatados con la coloración de Azul de Alcian, contrastado con Hematoxilina de Harris.

Los cortes coloreados con azul de alcian a un pH de 2.5 confirman la presencia de mucopolisacáridos sulfatados (coloración azul). Estos mucopolisacáridos se acumulan desde etapas tempranas de la ontogenia de los esporangios en las paredes y espacios presentes entre las células del tejido esporógeno (Fig. 42). A medida que el tejido esporógeno se diferencia en esporocitos y estos son liberados en la cavidad esporangial, los mucopolisacáridos son especialmente abundantes (Fig. 43-45). De igual forma, estos compuestos son abundantes durante las etapas tempranas de la formación de las tétradas (Fig. 46) y disminuyen progresivamente con la maduración del esporangio (Fig. 47-49). Las células que conformaran la pared del esporangio en etapas inmaduras son azul de alcian positivo (Fig. 44-45 y 48) sin embargo, a medida que las paredes anticlinales y la periclinal interna se lignifican y engrosan se tornan azul de alcian negativo, tomando la coloración café característica de la hematoxilina cuando tiñe tejidos lignificados. En contraste, la pared periclinal externa que no se lignifica presenta la reacción azul de alcian positiva (Fig. 49). Las esporas maduras son azul de alcian negativas (Fig. 50).



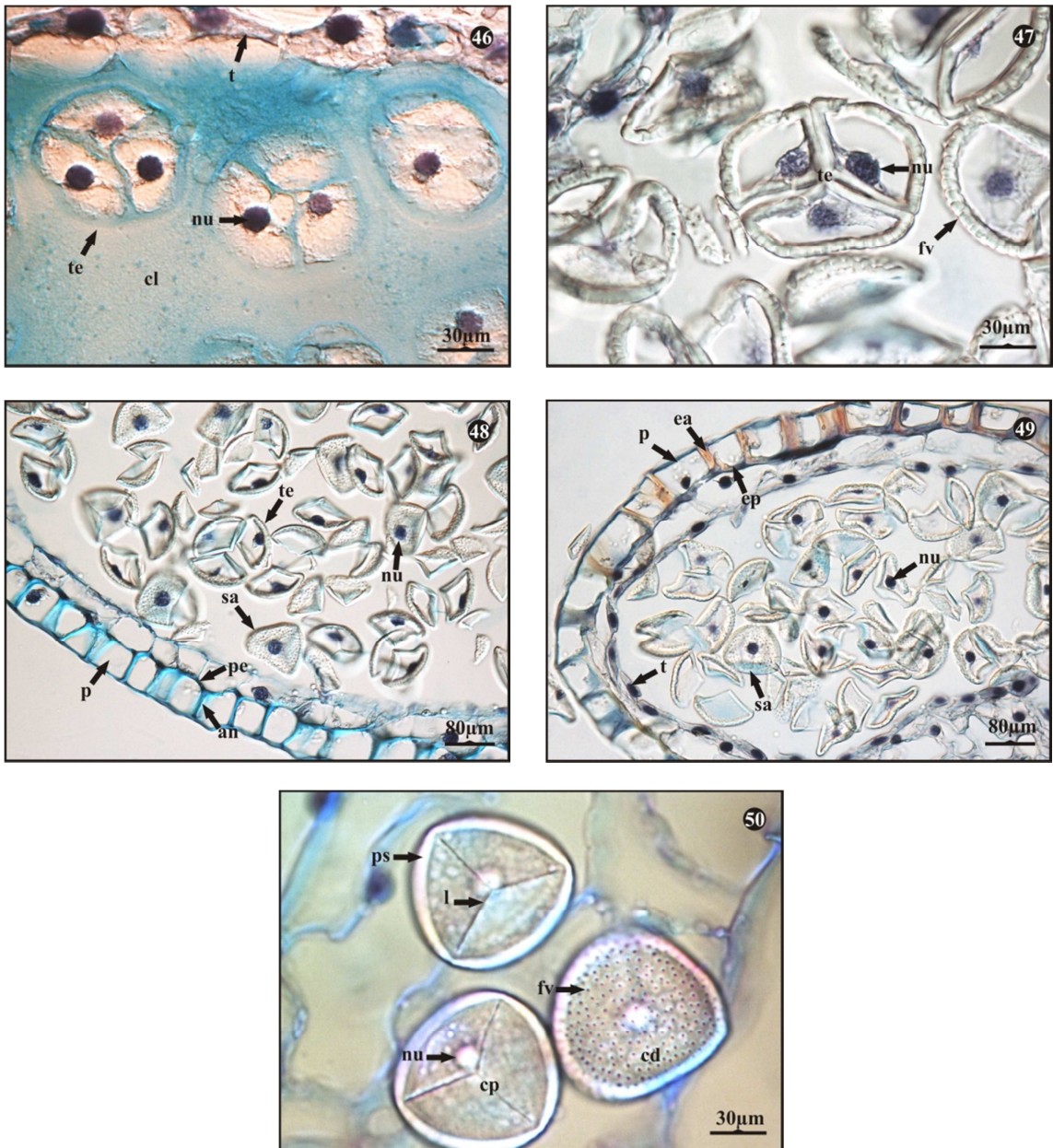


Figura. 42-50. Identificación de mucopolisacáridos sulfatados durante la esporogénesis de *H. phyllicifolia*, utilizando la tinción de azul de alcian. **42.** Esporangios en maduración. Se aprecian la acumulación de mucopolisacáridos entre las células del tejido esporógeno. **43-45.** Esporocitos inmersos en la cavidad esporangial, rodeados de abundantes mucopolisacáridos. **46.** Tétradas inmaduras, los mucopolisacáridos son evidentes. **47-48.** Esporangios y tétradas en diferentes momento de maduración. En la cavidad del esporangio, los mucopolisacáridos disminuyen drásticamente. **49.** Esporas inmaduras y células que conforman la pared del esporangio azul de alcian negativo. **50.** Esporas maduras, evidentemente, azul de alcian negativo. an: pared anticlinal, cd: cara distal, cl: cavidad esporangial, cp: cara proximal, ea: engrosamiento anticlinal, ep: engrosamiento periclinal, es: esporocito, fv: foveola, l: lesura trirragada, nu: núcleo, p: pared del

esporangio, pe: pared periclinal, ps: pared de la espora, sa: espora, t: tapete, te: tétrada, ts: tejido esporógeno.

7.2.5. Identificación de calosa con la coloración de Azul de anilina, utilizando radiación UV (Filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm)

Las pruebas de calosa utilizando la coloración de azul de anilina fueron negativas. Los cortes permanentes sin azul de anilina (control) esporas y tétradas presentan coloración amarillo/rojizo en tanto que la pared del esporangio emite una coloración azul brillante (Fig. 51). Para los montajes con azul de anilina el comportamiento es similar (Fig. 52).

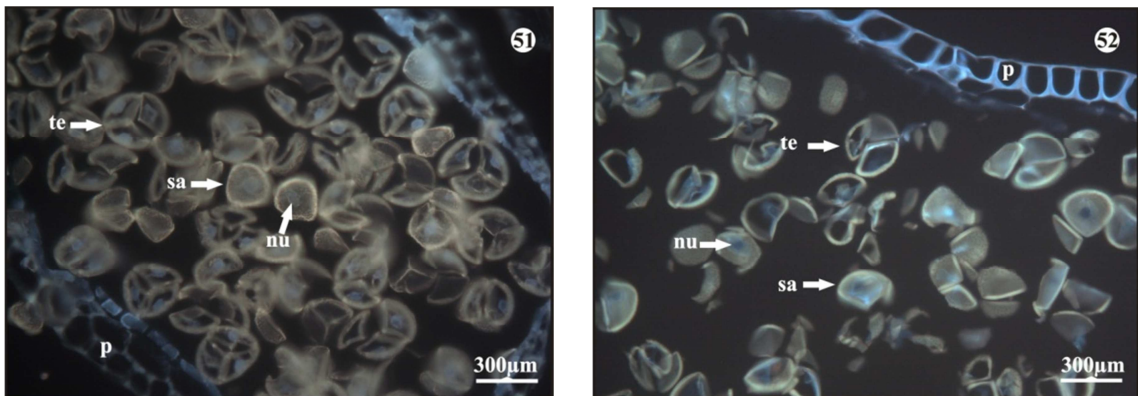


Figura 51-52. Florescencia de las estructuras implicadas en la esporogénesis utilizando radiación ultravioleta de preparados en parafina teñidos con azul de anilina para detectar la presencia de calosa. **51.** Preparado de *H. phyllicifolia* sin azul de anilina; se observa la emisión de luz azul brillante en las células de la pared del esporangio y color amarillo/rojizo en tétradas y esporas. **52.** Preparado de *H. phyllicifolia* con azul de anilina; se observa la emisión de luz azul brillante en las células de la pared del esporangio y coloración amarillo/rojizo en tétradas y esporas. nu: núcleo, p: pared del esporangio, sa: espora, te: tétrada.

7.3 Morfometría de algunas estructuras asociadas al esporangio y las esporas de *H. phyllicifolia*

Para las medidas de las estructuras involucradas en el proceso de la ontogenia y esporogénesis de *H. phyllicifolia* se utilizaron preparaciones microscópicas permanentes y transitorias. Las tétradas maduras se midieron en posición radial las cuales tuvieron una medida mínima de 104, 01 μm y una máxima de 121,10 μm y para la posición lateral una medida mínima de 105,83 μm y una máxima de 127,74 μm . En cuanto a las células de la pared se midieron tanto el engrosamiento

periclinal con una medida mínima de 6,80 μm y una máxima de 20,42 μm como los engrosamientos anticlinales con un mínimo de 6,37 μm y un máximo de 31,84 μm . También se midió el ancho de los pedicelos que sostienen a los esporangios maduros, la medida mínima fue de 233,33 μm y la máxima de 345,41 μm y el largo de este con un mínimo de 574,68 μm y un máximo de 321,70 μm . Las medidas de las esporas maduras en la cara proximal el eje ecuatorial dieron un mínimo de 61,30 y un máximo de, 72,67. Los datos se muestran en la tabla 1.

Medidas <i>Huperzia phylcifolia</i> (μm) Utilizando n=30		Medida Mínima	Medida Máxima	Media desviación estándar	y
Tétradas	Posición Lateral	105,83	127,74	115,59 \pm 4,78	
	Posición Radial	104,01	121,10	111,54 \pm 3,80	
Células de la pared	Engrosamientos de las paredes anticlinales	6,37	31,84	15,35 \pm 6,14	
	Engrosamientos de las paredes periclinales	6,80	20,42	14,25 \pm 3,89	
Pedicelo	Ancho en posición Sagital	233,33	345,41	290,79 \pm 37,89	
	Largo en posición, Sagital	321,70	574,68	438,88 \pm 73,03	
Esporas	Cara proximal (eje ecuatorial)	61,30	72,67	67,67 \pm 3,32	

Tabla 1. Medidas Morfométricas de *H. phylcifolia*.

8. DISCUSION

Todas las etapas del desarrollo de los esporangios de *H. phyllicifolia* se pueden encontrar en un mismo estróbilo maduro; es decir, maduran de forma basípeta con esporangios maduros en la región basal del estróbilo e inmaduros en la parte apical; esta situación es similar a lo descrito por Sikes (1908), Rolleri (1972 a-b) y Uehara & Kurita (1991) para *Lycopodium*. Así mismo, Øllgard (1987) para *Phylloglossum* y *Lycopodiella*, Rincón *et al.* (2009) para *H. brevifolia*, Bravo *et al.* (en prep.)¹ para *H. tetragona*, Gelvez *et al.* (en prep.)¹ para *L. clavatum* y *L. thyoides*, en *L. cernua* y *L. descendens* Forero *et al.* (en prep.)¹ y Rincón *et al.* (en prep.)¹ para otras especies de *Huperzia*; lo que podría sugerir algo de uniformidad en cuanto a la ontogenia esporangial entre los géneros de licopodiáceas.

Los esporangios de las licopodiáceas se originan sobre la cara adaxial de los micrófilos o de los esporofilos jóvenes, cerca de la inserción de éstos en el eje caulinar (Sikes 1908, Rolleri 1972a, Bruce 1976, Øllgaard 1987, Rincón *et al.* 2009). Esta situación es similar a lo encontrado en *H. phyllicifolia*, así como en otros trabajos en Lycopodiaceae (en preparación, citados anteriormente).

En las etapas iniciales de la morfogénesis de los esporangios de *H. phyllicifolia* las células epidérmicas que los originaran se dividen periclinalmente para producir dos estratos celulares: uno basal, que origina el pedicelo y otra superficial, que origina la pared del esporangio y el tejido esporógeno. Posteriormente, por sucesivas divisiones periclinales y anticlinales, aumenta el número de células con lo cual da inicio la diferenciación del esporangio, esta condición es similar a lo descrito por Rincón *et al.* (2009) en *H. brevifolia* y otras especies de *Lycopodium* y *Lycopodiella* (Rolleri 1972a, Bruce 1976a) entre otros (en preparación, citados anteriormente).

Los esporocitos observados durante la ontogenia de los esporangios de *H. phyllicifolia* se forman a partir de la diferenciación del tejido esporógeno, estos exhiben una cubierta que permanece intacta hasta el momento de la liberación de las esporas, denominada cubierta del esporocito ("*sporocite coat*"); nombre

¹ Referidos de aquí en adelante como en preparación, citados anteriormente.

acuñado por Pettit & Jermy (1974), para designar la cubierta superficial que se forma sobre las células madre de esporocitos de los pteridófitos en general. En contraste, Rincón *et al.* (2009) determinaron en *H. brevifolia* que la cubierta del esporocito se pierde en algún momento de la meiosis y se vuelve a constituir durante la meiosis II. Sin embargo, en trabajos posteriores (en preparación, citados anteriormente), estos mismos autores utilizando otras técnicas de montaje encontraron que en realidad la cubierta del esporocito no se pierde y por consiguiente la situación descrita por Rincón *et al.* (2009) correspondería a artefactos de montaje por las técnicas empleadas en la preparación de las muestras. Por lo que se concluye que la cubierta del esporocito en las Licopodiáceas se mantiene durante todo el proceso de esporogénesis.

El proceso de meiosis I observado en *H. phyllicifolia* que sufren los esporocitos, es simultánea y termina con la formación del estado de diada; en la cual no se desarrolla una pared que separe los núcleos. Este comportamiento es similar a lo observado en *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009) y para otras Licopodiáceas (en preparación, citados anteriormente). Este comportamiento también se presenta durante la meiosis en algunos briofitos y pteridofitos (Furness *et al.* 2002). Estos autores establecen que este tipo de meiosis está relacionado con los grupos de plantas que producen esporas triletes, en contraste con otros grupos de pteridófitos que producen esporas monoletes y que, generalmente, presentan división sucesiva. Así mismo, señalan que la división simultánea se puede considerar un carácter ancestral y que la sucesiva ha surgido de manera independiente a lo largo del proceso evolutivo.

El estrato celular externo de la pared del esporangio de *H. phyllicifolia* presenta engrosamientos lignificados en forma de "U", característica descrita por Øllgaard (1975) para las licopodiáceas en general, como también en estudios más recientes para otras especies de *Huperzia*, *Lycopodium* y *Lycopodiella* (Rincón *et al.* 2009) y otros (en preparación, citados anteriormente). Estos engrosamientos se desarrollan a medida que el esporangio madura y le confieren resistencia suficiente para contener el número creciente de esporas que sólo se liberarán en la madurez. Así mismo, es posible que faciliten su liberación, actuando como un efecto de resorte en la dispersión de las esporas a cierta distancia de la planta original. Esta idea se soporta ya que las paredes anticlinales y la periclinal interna son fuertemente lignificadas en tanto que la periclinal externa no. Sin embargo, poco se sabe de estos mecanismos, excepto los descritos para helechos

leptosporangiados (Slosson 1906, Bierhorst 1971, Moran 2004) y algunos licófitos heterosporados (Webster 1995, Schneller *et al.* 2008), sin existir indicios de que ocurran en licófitos homosporados.

El tapete es una estructura omnipresente en plantas se relaciona con los procesos de esporogénesis en briofitos y pteridofitos y en la microporogénesis de gimnospermas y angiospermas; este puede ser secretor o plasmodial (Parkinson & Pacini 1995, Furness *et al.* 2002, Furness 2008). El tapete, favorece la dispersión de esporas y granos de polen (Pacini & Frenchi 1993), también aporta sustancias de reserva y ayuda con la formación de precursores biosintéticos del esporodermo y de la pared de los granos de polen (Lugardon 1990, Polowick & Sawhney 1993, Parkinson & Pacini 1995, Pacini 1997, Furness & Rudall 2001, Furness 2008). El tapete de *H. phyllicifolia* es de tipo secretor ya que se establece a partir de la capa celular interna de la pared del esporangio y prospera hasta finalizado el proceso de maduración de esporas; evidenciando así la función nutricia y el papel en la síntesis de precursores de la pared de las esporas y granos de polen (Uehara & Kurita 1991, Piffanelli *et al.* 1998, Rincón *et al.* 2009). Teniendo en cuenta lo anterior se puede concluir que hay una uniformidad ontogenética en cuanto a la formación y función del tapete.

Los esporangios de *H. phyllicifolia* presentan dos valvas, como en la mayoría de las lycopodiáceas y la liberación de esporas tiene lugar por la separación de las valvas a través de la dehiscencia como sugirió Rolleri (1975), Øllgaard (1987), Pita *et al.* (2006), Rincón *et al.* (2009) y para otras lycopodiáceas (en preparación, citados anteriormente).

Las esporas de *Huperzia phyllicifolia* es foveolada en la cara distal y alisada en la cara proximal como lo propone Wilce (1972), Øllgaard (1987), Tryon & Lugardon (1991) y Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005).

El análisis de los datos morfométricos indica que las medidas del eje ecuatorial de las esporas de *H. phyllicifolia* se encuentra por encima ($\bar{X}=67,67\mu\text{m}$) de la variación encontrada por Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005) para algunas especies de *Huperzia* de Colombia, aunque en este estudio, *H. phyllicifolia* no fue incluida y es posible encontrar cierto grado de variación fenotípica producto de factores

ambientales. Es de destacar que esta medida es la que presenta un menor grado de variación ($\pm 3,32 \mu\text{m}$) entre todas las medidas tomadas y por consiguiente sería importante realizar un estudio de mayor envergadura que cubriera varias localidades en diferentes ambientes donde se encuentre *H. phyllicifolia* para discernir qué tanto de esta variación depende de los factores ambientales y por consiguiente, si es un carácter robusto a utilizar en taxonomía. De la misma forma, merecen consideración, la medida de las tétradas en posición radial ($\pm 3,80 \mu\text{m}$), y los engrosamientos de las paredes periclinales del esporangio maduro ($\pm 3,89 \mu\text{m}$) ya que presentan un variabilidad baja en relación a otros datos tomados. El largo y el ancho del pedicelo que sostiene el esporangio son las medidas con mayor variabilidad ($\pm 73,03$ y $\pm 37,89 \mu\text{m}$), lo que implicaría que esta característica sería probablemente poco útil en taxonomía.

Durante la esporogénesis de *H. brevifolia* Rincón *et al.* (2009) observaron material lipídico a nivel del citoplasma en los esporocitos premeióticos. Esta característica, también, fue descrita por Uehara & Kurita (1991) para *L. clavatum* y por Lugardon (1990) y Uehara & Kurita (1989) en otros pteridófitos. Esta situación es similar a la encontrada en *H. phyllicifolia*, pudiéndose evidenciar la naturaleza lipídica de estos depósitos mediante la coloración de Sudan III. Sin embargo, a diferencia de lo observado por estos autores, también se apreció que este material lipídico se presenta entre la cubierta del esporocito y el esporocito. La internalización y el aumento de estos lípidos entre las tétradas en maduración de *H. phyllicifolia*, podría indicar la importancia de estos materiales como sustancias de reserva y/o en la formación del esporoderma (Piffanelli *et al.* 1998, Ariizumi & Toriyama 2011). De hecho, se ha demostrado que los principales precursores de la esporopolenina, que es el principal constituyente de los granos de polen y esporas maduras, son cadenas largas de ácidos grasos saturados (Schraudolf & Haag 1985, Dominguez *et al.* 1999, Piffanelli *et al.* 1998, Eliseu & Dinis 2008, Ariizumi & Toriyama 2011), lo cual podría explicar el comportamiento de los depósitos de lípidos encontrados en la esporogénesis de *H. phyllicifolia*. Esta situación también se ha evidenciado en otras especies de Lycopodiaceae (en preparación, citados anteriormente).

En *H. phyllicifolia* se demostró que el almidón se va acumulando a medida que transcurre el proceso de esporogénesis hasta la etapa de tétradas inmaduras y posteriormente hay una disminución de este compuesto, siendo no detectado en tétradas maduras y esporas. Esta situación es de esperar ya que el almidón es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas (Evert & Eichhorn

2006, Tofiño *et al.* 2006, Taiz & Zeiger 2010) y más aún, si se considera que este compuesto es la principal fuente de reserva energética en las estructuras vegetativas en licopodios (Rolleri 1972a, Ibars *et al.* 1988). Este aumento en concentración de almidón a medida que se avanza en el proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia* estaría indicando que esta sustancia es utilizada por estas células durante los momentos de gran actividad metabólica como fuente de energía como se ha observado en la mayoría de grupos de plantas (Cortella & Pochettino 1994, Tofiño *et al.* 2006, Taiz & Zeiger 2010). En contraste, en las esporas maduras no fue posible detectar almidón, lo cual, implicaría que estos compuestos no son tan importantes como reserva de energía a largo plazo en tanto las esporas germinan. Situación contraria a la observada para los lípidos, puesto que este compuesto es la principal reserva de la espora madura. Sin embargo, podría ser que el esporoderma sea impermeable al lugol o que no exista suficiente cantidad de almidón para ser detectado por esta técnica pues la principal fuente de reserva de las esporas son los lípidos. En contraste, con los granos de polen que almacenan principalmente almidón (Pacini 2000). Estas dos situaciones se explicarían por las diferentes estrategias durante los ciclo de vida que presentan las plantas productoras de esporas y polen. Mientras que los granos de polen deben ser llevados rápidamente por el viento o polinizadores hacia el estigma donde germinan (Dos santos & De Araujo 1999, Paccini 2000), una vez son liberados de las anteras; las esporas por lo general presentan dormición lo cual les permite soportar condiciones adversas, hasta poder germinar. En este sentido, poder almacenar energía en forma de lípidos, garantizaría la supervivencia de la espora a largo plazo (Gemmrich 1977, Demaggio & Greene 1980, Banks 1999).

En el proceso de la ontogenia y esporogénesis de *H. phyllicifolia* se detectó la presencia de sustancias PAS positivas principalmente en el citoplasma de los esporocitos; ya que la reacción del ácido periódico de Schiff detecta todo tipo de polisacáridos, estas sustancias podría corresponder a reservas, posiblemente almidones que servirían como fuente de energía a corto plazo, dado la alta tasa metabólica de las células en este momento (Evert & Eichhorn 2006, Tofiño *et al.* 2006, Taiz & Zeiger 2010). En contraste, los mucopolisacáridos sulfatados detectados con el azul de alcian se evidencian en etapas tempranas del proceso de esporogénesis de *H. phyllicifolia*, principalmente entre las células del tejido esporógeno y se acumula progresivamente en la cavidad esporangial hasta la formación de las tétradas inmaduras. Posteriormente, estos compuestos desaparecen con la maduración de las tétradas y esporas. Este comportamiento

de los mucopolisacáridos sulfatados, podría evidenciar que estos posiblemente evitan la desecación de aquellas células más susceptibles a deshidratarse durante las etapas tempranas de la esporogénesis (Bruce 1976, Pacheco *et al.* 2003, Majdoub *et al.* 2010, Ghanem *et al.* 2010). La resistencia de las esporas a la desecación y su capacidad de entrar en dormición, podría soportar esta idea.

La calosa es un compuesto importante durante la microsporogénesis ya que ayuda a formar la exina y por consiguiente en la maduración y formación de las paredes de los granos de polen (Takahashi 1986, Takahashi 1988, Meier-Melikyan *et al.* 2003, Teng *et al.* 2005, Anger & Weber 2006, Blackmore 2007, Blackmore *et al.* 2007). La presencia de este compuesto en el proceso de esporogénesis de las criptógamas es incierta y ha sido registrada solo en algunas hepáticas y helechos (Brown & Lemmon 1990). Sin embargo, Long (2003) concluyó que la calosa está ausente en antocerotes. Esta condición es similar lo encontrado en *H. phyllicifolia*, así como en otras lycopodiáceas (en preparación, citados anteriormente). Por consiguiente, los patrones de fluorescencia obtenidos en esta especie al ser iluminados con luz ultravioleta, se explicarían en la autofluorescencia emitida por las sustancias que conforman la pared de las esporas en formación. De esta manera, la esporopolenina emite autofluorescencia amarillo/rojizo en tanto que la lignina autofluorescencia azul brillante (Rost 1995, Ruzin 1999).

9. CONCLUSIONES

- En un solo estróbilo de *H. phyllicifolia* se puede observar la ontogenia de los esporangios y esporogénesis debido a que estos maduran de forma basípeta.
- Los esporangios de *H. phyllicifolia* se originan a partir de células epidérmicas localizadas sobre la cara adaxial de los esporófilos jóvenes por la presencia de estróbilos definidos.
- La cubierta de los esporocitos perdura durante todo el proceso de esporogénesis y solo desaparece en el momento de la liberación de las esporas en la cavidad esporangial.
- El tapete del esporangio de *H. phyllicifolia* es secretor, se establece a partir de la capa celular interna de la pared del esporangio y prospera hasta finalizado el proceso de maduración de esporas evidenciando así la función de este como nutricia contribuyendo al desarrollo de las esporas y formación del esporoderma.
- Las tétradas de *H. phyllicifolia* pasan por diferentes estados de maduración hasta el momento que se establece el patrón de ornamentación foveolada de la pared de la spora.
- Mediante las técnicas histoquímicas (PAS, azul de alcian, lugol, sudan III) se pudo evidenciar la presencia de mucopolisacáridos sulfatados, almidón y lípidos que estarían relacionadas con la maduración de las esporas. El almidón actúa como fuente de energía en momentos de gran actividad metabólica, los lípidos son componentes de las esporopolenina y también sirven como fuente de energía y los mucopolisacáridos previenen de la desecación.

- La calosa no se encontró dentro del proceso de esporogénesis de *H. phylicifolia*.
- El género *H. phylicifolia* presenta similitudes en cuanto a la ontogenia del esporangio y esporogénesis con otras Licopodiáceas.

10. RECOMENDACIONES

Fomentar la elaboración de más trabajos sobre la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis en Licófitos para de esta forma entender a mayor profundidad los procesos de evolución de este grupo antiguo de plantas.

Deben realizarse estudios estructurales, ultraestructurales e histoquímicos que permitan detallar procesos cruciales durante la evolución de las plantas, que traten de dar respuesta a los siguientes interrogantes:

¿Los esporocitos de los cuatro géneros de Lycopodiales son monoplastídicos o poliplastídicos?

¿La ontogenia y ultraestructura del esporoderma es igual en los cuatro géneros?

¿Cuál es el comportamiento de las proteínas y otras moléculas orgánicas durante el proceso de esporogénesis en estos grupos?

11. LITERATURA CITADA

- Anger, E. & M. Weber. 2006. Pollen-wall Formation in *Arum alpinum*. *Ann. Bot.* 97: 239–244.
- Ariizumi, T. & K. Toriyama. 2011. Genetic Regulation of Sporopollenin Synthesis and Pollen Exine Development. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 62:437–60.
- Banks, J.A. 1999. Gametophyte development in ferns. *Annu. Plant. Physiol.* 50:163–86.
- Bierhorst, D. 1971. Morphology of vascular plants. The Macmillan Company. Nueva York, EEUU.
- Blackmore, S., A.H. Wortley, J.J. Skvarla, J.R. Rowley. 2007. Pollen Wall Development in Flowering. *New Phytologist.* 3: 483-498.
- Blackmore, S. 2007. Pollen and spores: Microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. *Plant. Systemat. Evol.* 263: 3–12.
- Brown, C.R & B.E. Lemmon. 1990. Sporogenesis in bryophyta. 56-94. *In* S. Blackmore & R.B.Knox (eds). *Microspores: Evolution and ontogeny.* Academic Press, Londres, Inglaterra.
- Bruce 1976a. Comparative Studies in the Biology of *Lycopodium carolinianum*. *Amer. J. Bot.* 66:4.
- Bruce, J. G. 1976. Development and distribution of mucilage canals in *Lycopodium*. *Amer. J. Bot.* 63: 481-491.
- Bruce, J.G. 1979. Gametophyte of *Lycopodium digitatum*. *Am. J. Bot.* 66:1138–1150.
- Caldas, M.R., O. Ricaurte, G. Rodríguez, J. Amaya. 1995. Microscopia de alta resolución "M.O.A.R" manual de procedimientos.

- Cortella, A.R. & M.L. Pochettino. 1994. Starch grain analysis as a microscopic diagnostic feature in the identification of plant material. *Econ. Bot.* 48: 171-181.
- Demaggio, A. E & C. Greene. 1980. glyoxylate and glycolate cycle activity in *onoclea sensibilis l.* *Plant. Physiol.* 66: 922-924.
- Domínguez, E., J.A. Mercado, M.A. Quesada, A. Heredia.1999. Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sex. Plant. Reprod.* 12:171–178.
- Dos santos, R.P. & J. E. De Araujo. 1999. Storage substances in the androgametogenesis and mature pollen grainof *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) *Rev. Bras. Bot.* 22: 125-13.
- Duarte, A.R., R.G. Bogotá & L.C. Jiménez. 2006. Atlas de las esporas de pteridofitos de Chipaqué (Cundinamarca, Colombia).*Caldasia.* 28:327-357.
- Eliseu, S.A. & A. M. Dinis. 2008. Ultrastructure and cytochemistry of *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) pollen grain. *Grana.* 47: 39- 51.
- Evert, R.F & S.E. Eichhan. 2006. Esau's plant Anatomy: meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function, and development. P. 601. 3rd Edition. Wiley- Liss.
- Furness, C. A & P.J Rudall. 2001. The tapetum in basal angiosperms: Early diversity. *Int J Plant Sci.*162: 375-392.
- Furness, C.A., P.J. Rudall & B.F. Sampson. 2002. Evolution of microsporogénesis in angiosperms. *Int. J. Plant. Sci.* 163: 235-260.
- Furness, C. A. 2008. A review of the distribution of plasmodial and invasive tapeta in eudicots. *Int. J. Plant. Sci.* 169: 207-223.
- Gemrich, A.R. 1977. Fatty acid composition of fern spore lipids. *Phytochemistry.* 16:1044-1046.

- Ghanem, M.E., R. Han, B. Classen, J. Quetin-Leclercq, J.G. Mahy, C. Ruan, P. Qin, F. Perez & S. Lutts. 2010. Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress. *J. Plant. Physiol.* 167: 382–392.
- Goodger, Q.D., A.L. Whincup, A.R. Field, A.M. Holtum & I. E. Woodrow. 2008. Variation in huperzine A and B in Australasian *Huperzia* species. *Biochem. Systemat. Ecol.* 36: 612-618.
- Grauvogel-Stamm, L. & B. Lugardon. 2009. Phylogeny and evolution of the horsetails: Evidence from spore wall ultrastructure. *Review of Palaeobotany and Palynology.* 156: 116–129.
- Guo Ji, S., K.K. Huo, J. Wang & S. Li pan. 2008. A molecular phylogenetic study of Huperziaceae based on chloroplast *rbcL* and *psbA-trnH* sequences. *J. Systemat. Evol.* 46: 213–219.
- Hackney, F.M.V. 1950. A review of and contribution to knowledge of *Phylloglossum drumondii* Kunze. *Proc. Linn. Soc. New. S. Wales.* 75:133-152.
- Haseloff, J. 2003. Old botanical techniques for new microscopes. *Biotechniques.* 34:1174-1182.
- Houghton, P.J. & M.J Howes. 2005. Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals.* 14: 6-22.
- Ibars, A.M. M. Vilar, J. Iranzo & A. E. Salvo. 1988. Sobre la distribución del almidón en las Lycopodiales. *Acta Botánica Malacitana.* 13: 141-150.
- Izco, J., I. Pulgar, Z. Aguirre & F. Santin, 2007. Estudio florístico de los páramos de pajonal meridionales de Ecuador. *Peru biol.* 14: 237-246.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique.* McGraw-Hill. Nueva York, EEUU.

- Judd, W.S., C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens & M.J Donoghue. 2007. Plant Systematics: A phylogenetic approach. p. 565. Sinauer Associates inc. 3rd.
- Long, J.A. 2003. Ultrastructure and cytochemistry of sporogenesis in two bryophytes, *notothylas* and *takakia*. Tesis de maestria, Universidad Carbondale.
- Lugardon, B. 1990. Pteridophyte sporogenesis: a survey of spore wall ontogeny and fine structure in a polyphyletic plant group. p. 95-120. *In* Blackmore, S & R.B.Knox (eds). Microspores: Evolution and ontogeny. Academic Press. Londres. Inglaterra.
- Ma, X.Q., D.Y. Zhu & S. Jiang. H. 1998. Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of Lycopodiaceae Sensu Lato occurring in China and their contribution to classification. *Biochem. Systemat. Ecol.* 26: 723-728.
- Ma, X., C. Tan, D. Zhu & D.R. Gang. 2006. A survey of potential huperzine A natural resources in China: The Huperziaceae. *J. Ethnopharmacol.* 104: 54–67.
- Ma, X., C. Tan, D. Zhu, D.R. Gang & X. Peigen. 2007. Huperzine A from *Huperzia* species An ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 113:15-34.
- Ma, X. & D.R. Gang. 2008. In vitro production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry.* 69: 2022–2028.
- Majdoub, H., L. Picton, D. Le Cerf & S. Roudesli. 2010. Water Retention Capacity of Polysaccharides from Prickly Pear Nopals of *Opuntia Ficus Indica* and *Opuntia Litoralis*. *J. Polym. Environ.* 18:451–458.
- Meier-Melikyan, N.R., N.I. Gabaraeva, S.V. Polevova , V.V. Grigor'eva, Y.V. Kosenko & M.V. Tekleva. 2003. Development of Pollen Grain Walls and Accumulation of Sporopollenin. *Russ J. Plant. Physiol.* 50:330–338.
- Mena, V. P. & R. Hofstede. 2006. Los páramos ecuatorianos. p. 91-109. *In* M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev.

Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz.

- Moran, R. C. 2004. A natural history of ferns. Timber Press. Portland. Oregon. EEUU.
- Moran, R. C. 2008. Diversity, biogeography, and floristics. p. 367-393. *In* Ranker, T. A & C, H. Haufler (eds). *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge University Press. Nueva York.
- Moreno, R.A.A. & J. Murillo. 2000. Pteridofitos de Colombia III. Los pteridofitos de la región Araracuara (Amazonia Colombiana). *Biota Colombiana*. 1: 217-223.
- Murillo, M. T. & M. Harker. 1990. Helechos y plantas afines de Colombia. *Acad. Colomb. Cienc. Exac. Fis. Nat. Colección Jorge Álvarez Lleras*. 12. Bogotá. Colombia.
- Murillo, M.T. & J. Murillo. 1999. Pteridófitos de Colombia I. Composición y distribución de las lycopodiaceae. *Rev. Acad. Col. Ciencias*. XXIII: 19-38.
- Øllgaard, B. 1975. Studies in Lycopodiaceae, I. Observations on the structure of the sporangium wall. *Amer. Fern J.* 65: 19-27.
- Øllgaard, B. 1987. A revised classification of the Lycopodiaceae. *Lat. Opera Bot.* 92: 153-178.
- Øllgaard, B. 1988. Lycopodiaceae. *In* G. Harling & L. Andersson (eds). *Flora of Ecuador*. No. 33 Arlöv Berlings. Quito. Ecuador.
- Øllgaard, B. 1992. Neotropical Lycopodiaceae-an overview. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 79: 687-717.
- Øllgaard, B. 1996. Neotropical Huperzia (Lycopodiaceae)-distribution of species richness, p. 93-100. *In* J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (Eds.). *Pteridology in Perspective*. Royal Bot. Gardens. Inglaterra.

- Ortega, M.G., A.M. Agnese, J.L. Cabrera. 2004. Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine*. 11: 539-543.
- Pacini, E. & G. Franchi. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant. Syst. Evol.* 7: 1-11.
- Pacini, E. 1997. Tapetum character states: analytical keys form tapetum types and activities. *Can. J. Bot.* 75: 1448-1459.
- Paccini, E. 2000. From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant. Syst. Evol.* 222: 19-43.
- Parkinson, B.M & E. Pacini. 1995. A comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms. *Plant. Syst. Evol.* 198: 55-88.
- Pacheco, L., S. M. Mociño, D. S. Puente & B. Granados. 2003. Estructuras mucilaginosas en helechos y plantas afines con énfasis en el género *Diplazium* (Woodsiaceae). *Contactos*. 48: 56-60.
- Pettitt, J. M & A.C Jeremy. 1974. The surface coats on spores. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 6: 245-257.
- Piffanelli, P., J.H.E. Ross & D.J. Murphy. 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex. Plant. Reprod.* 11:65–80.
- Pita, P., N. De Menezes & J. Prado. 2006. Morfología externa e interna das folhas vegetativas, esporofilos e esporângios de espécies de *Huperzia Bernh.* (Lycopodiaceae-Pteridophyta) do Brasil. *Rev. Bras. Bot.* 29:115-131.
- Polowick, P.L. & V.K. Sawhney. 1993. Differentiation of the tapetum during microsporogénesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with special reference to the tapetal cell wall. *Ann. Bot.* 72: 595-905.
- Ramírez, P.B.R & D.J. Macías. 2007. Catálogo de helechos y plantas afines del departamento del Cauca. p. 215. Universidad del Cauca. Popayán.

- Rangel Ch., J.O. (ed). 2000. Colombia, diversidad biótica III. La región de vida paramuna. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá.
- Raubeson, L. A & R.K. Jansen. 1992. Chloroplast DNA Evidence on the Ancient Evolutionary Split in Vascular Land Plants. *Science*. 255:1697-1699.
- Renzaglia, K.S., R.J. Duff, D.L. Nickrent & D.J. Garbary. 2000. Vegetative and reproductive innovations of earlyland plants; implications for a unified phylogeny. *Philos. Trans. Ser. B*. 355: 769–793.
- Rincón, B.E.J., L.V. Gélvez, H.G. Forero, P.D. Arrieta & J.S. Hleap. 2009. Ontogenia del esporangio y esporogénesis del licopodio *Huperzia brevifolia* (Lycopodiaceae) de las altas montañas de Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 57: 1141-1152.
- Rodríguez, S., S. Soares de Almeida, C.A. Laíse de Holanda, I.C. Barros, M.E. Van Den Berg. 2004. Composição florística e abundância de pteridófitas em três ambientes da bacia do rio Guamá, Belém, Pará, Brasil. *Acta amazônica*. 34:35-42.
- Rolleri, C.H 1972a. Morfología comparada de las especies de "*Lycopodium*" (Pteridophyta-Lycopodiaceae) para el noroeste argentino. *Rev. Mus. La Plata*. 12: 223-317.
- Rolleri, C.H. 1972b. Sobre la presencia y naturaleza de la endodermis en especies de *Lycopodium* L. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14: 365-369.
- Rolleri, C.H. & E.R. De la Sota. 1972. Sobre la presencia de *Lycopodium magellanicum* (Pal. Beauv.) Sw. en el noroeste de Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14:198-202.
- Rolleri, C.H. 1974. Morfología de *Lycopodium fuegianum* Roivanen, Lycopodiaceae- Pteridophyta. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15: 365- 383.
- Rolleri, C.H. 1975. A new species of *Lycopodium* L. from the Peruvian Andes. *Amer. Fern. J.* 65: 3-6.

- Rolleri, C.H. 1976. Acerca de los conductos glandulares en hojas de *Lycopodium alopecuroides* L. Lycopodiaceae-Pteridophyta. Bol. Soc. Argent. Bot. 16:397-405.
- Rolleri, C.H. 1977a. Correlation of morphology and geographical distribution in *Lycopodium saururus* Lam. American. Fern. Journal. 67: 109-120.
- Rolleri C.H. 1977b. Estudios morfológicos y sistemáticos en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L. *L. crassum* Humb. & Bonpld. Ex Willd. y *L. saururus* Lam. Rev. Mus. La Plata, Obra del Centenario III (Botánica): 97-110.
- Rolleri, C.H. 1979. Análisis morfológico y revisión sistemática de las especies andino-patagónicas del género *Lycopodium* L. Lycopodiaceae-Pteridophyta. Physis (Buenos Aires). 95: 39-62.
- Rolleri, C.H. 1980. Estudios morfológicos y sistemáticos en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L. *L. brevifolium* Hook. & Grev. y *L. rufescens* Hook. Bol. Soc. Argent. Bot. 19: 243-254.
- Rolleri, C.H. 1981. Sinopsis de las especies de *Lycopodium* L. (Lycopodiaceae Pteridophyta) de la sección *Crassistachys* Herter. Rev. Mus. La Plata N S Bot.12: 61-114.
- Rolleri, C.H. 1982a. El número cromosómico *Lycopodium saururus* Lam. (Lycopodiaceae-Pteridophyta) y sus implicancias sistemáticas. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 13: 115-118.
- Rolleri, C.H. 1982b. El número cromosómico de *Lycopodium clavatum* L. subsp. *clavatum* (Lycopodiaceae-Pteridophyta) y sus implicancias sistemáticas. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 13: 119-122.
- Rolleri, C.H. & A.M. Deferrari. 1986. Modelos epidérmicos y otros caracteres foliares en la sistemática y ecología de *Lycopodium* L., sección *Crassistachys* Herter. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 14: 65-87.

- Rolleri, C.H. & A.M. Deferrari. 1989. Nota sobre la transferencia de especies del género *Lycopodium* L. (Lycopodiaceae-Mirbel) al género *Huperzia* Bernh. (Huperziaceae Roth.). Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 2: 151-157.
- Rolleri, C. H., C. Prada & O. G Martínez. 2010. *Huperzia reflexa* y *Lycopodiella cernua* (Lycopodiales - Pteridophyta): dos nuevas citas para el NO de la Argentina y actualizaciones sobre su morfología. Botánica Complutensis. 34: 41-48.
- Rost, F.W. 1995. Fluorescence Microscopy. Vol II. Cambridge. University Press.
- Ruzin, S. E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University, Nueva York, EEUU.
- Santa, J. 1986. Anatomía del tallo y suscripción genérica en Licopodiaceae. Actual. Biol. 15: 102-116.
- Santa, J. 1989. Estudio sobre la distribución de algunas licopodíneas de Colombia. Actual. Biol. 18: 95-103.
- Sanín, D., L.M. Álvarez, J.C. Mancera, R. Castaño & G. González. 2008. Monilófitos y licófitos de la cuenca del río Chinchiná (Caldas, Colombia). Clave para géneros y catálogo de las especies. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 32: 331-352.
- Schraudolf, H. & R. Haag. 1985. The Sporopollenin of the Schizaeaceous Fern *Anemia phyllitidis*. Naturwissenschaften 72: 433.
- Schneller, J., H. Gerber & A. Zuppiger. 2008. Speed and force of spore ejection in *Selaginella martensii*. Bot. Helv. 118:13–20.
- Slosson, M. 1906. How ferns grow. Henry Holt & Co Nueva York, EEUU.
- Smith, M.M & M.E. McCully. 1978. A critical evaluation of the Specificity of Aniline Blue Induced Fluorescence. Protoplasma. 95: 229-254.

- Smith, R.A., M.K. Pryer, E. Schuettpelz, P. Korall, H. Schneider & P.G. Wolf. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon*. 55: 705-731.
- Solé de Porta, N. & M.T. Murillo-Pulido. 2005. Estudio palino-botánico de algunas especies de Pteridophyta de Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 29: 183-218.
- Sykes, M.G. 1908. Notes on the morphology of the sporangium-bearing organs of the Lycopodiaceae. *New Phytol.* 7: 41-60.
- Taiz, L. & E. Zeger. 2010. *Plant Physiology*. Fifth Edition. p. 782. Sinauer Associates. Inc.
- Takahashi, M. 1986 Microsporogenesis in a parthenogenetic species, *Houttuynia cordata* thunb. (saururaceae). *Bot Gaz.* 147:47-54.
- Takahashi, H. 1988. Ontogenetic development of pollen tetrads of *drosera capensis* l. *Bot. Gaz.*149: 275-282.
- Tardie-blot, M.L. 1971. lycopodiáceas (Lycopodiaceae), 13 p. 8-9. *In* Keraudren-Aymonin, M. Flore de Madagascar et des Comores, familles 13 et 13 bis. Museum National d'Histoire Naturelle. Paris, Francia.
- Tejero, J.D., & M.L. Arreguín. 2004. Lista Con Anotaciones De Los. Pteridófitos Del Estado De México. México. *Acta Botánica Mexicana* 69: 1-82.
- Teng, N., Z. Huang, X. Mu, B. Jin, Y. Hu & J. Lin. 2005. Microsporogénesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition. *Flora.* 256-263.
- Tofiño, A., M. Fregene, H. Ceballos, D. Cabal. 2006. Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación. Artículo de Revisión derivado del Seminario II, Doctorado en Ciencias Agrarias, énfasis en Fisiología Vegetal, Universidad Nacional de Colombia Bogotá.
- Toursarkissian, M. 1971. Las Lycopodiaceae del noroeste de Argentina— estudio sistemático y anatómico. *Ann. Acad. Bras. Ciencias.* 43: 191-207.

- Tryon, R. & A. Tryon. 1982. Ferns and allied plants with special reference to tropical America. Springer Verlag. Nueva York.
- Tryon, A.F. & B. Lugardon. 1991. Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies. Springer-Verlag. Nueva York.
- Tryon, R.M. & R.G. Stolze. 1994. Pteridophyta of Peru. Part VI. 22. Marsileaceae-21. Isoetaceae. Fieldiana Botany N. S. 34: 1-190.
- Uehara, K & S. Kurita. 1989. An ultrastructural study of spore wall morphogenesis in *Equisetum arvense*. Am. J. Bot. 76: 939-951.
- Uehara, K & S. Kurita. 1991. Ultrastructural study on spore wall morphogenesis in *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae). Am. J. Bot. 78: 24-36.
- Vallejo, M.G., M.G. Ortega, J.L. Cabrera, V.P. Carlini, S. Rubiales de Barioglio & A.M. Agnese. 2007. *Huperzia saururus* increases memory retention in rats. J. Ethnopharmacol. 111: 685–687.
- Whittier, D.P & T.R. Webster. 1986. Gametophytes of *Lycopodium lucidulum* from axenic culture. Amer. Fern. J. 76:48–55.
- Whittier, D.P 1998. Germination of spores of the Lycopodiaceae in axenic culture. Amer. Fern. J. 88:106–113.
- Whittier, D.P. 2003. Rapid Gametophyte Maturation in *Ophioglossum crotalophoroides*. Amer. Fern. J. 93: 137-145.
- Whittier, D. P., J.C. Pintaud & J. E. Braggins. 2005. The Gametophyte of *Lycopodium deuterodensum* – Type II or I. Amer. Fern. J. 95: 22-29.
- Whittier, D.P. 2006. Gametophytes of four tropical, terrestrial *Huperzia* species (Lycopodiaceae). Amer. Fern. J. 96:54–61.
- Whittier, D. P & R. Carter. 2007. The Gametophyte of *Lycopodiella prostrate*. Amer. Fern. J. 97:230-233.

- Whittier, D. P & H, Storchova. 2007. The Gametophyte of *Huperzia selago* in Culture. Amer. Fern. J. 97: 149-154.
- Wilce, J. H. 1972. Lycopod spores, I. General spore patterns and the generic segregates of *Lycopodium*. Amer. Fern. J. 62: 365-79.
- Webster, T.R. 1995. Demonstrating Spore Dispersal in the Spikemoss, *Selaginella martensii*. Am. Biol. Teach. 57: 83-86.
- Wolf, P. G., K.G. Karol, D.F. Mandoli, J. Kuehl, J. Arumuganathan, N.W. Ellis, D.B. Mishler, D.G. Kelch, G.R. Olmstead & J.L. Boore. 2005. The first complete chloroplast genome sequence of a lycophyte, *Huperzia lucidula* (Lycopodiaceae). Gene. 350:117-128.
- Wu, Q. & Y. Gu. 2006. Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 40: 993-998.
- Xu, S.S., Z.Y. Cai, Z.W. Qu, R.M. Yang, Y.L. Cai, G.Q. Wang, X.Q. Su, X.S. Zhong, R.Y. Cheng, W.A. Xu, J.X. Li, B. Feng. 1999. Huperzine-A in capsules and tablets for treating patients with Alzheimer disease. Acta. Pharmacol. Sin. 20: 486-90.