

ONTOGENIA DE LOS ESPORANGIOS Y ESPOROGÉNESIS DE *Lycopodium clavatum* L. y *Lycopodium thyoides* Humb. & Bonpl. ex Willd. (LYCOPODIACEAE)

LEIDY VIVIANA GÉLVEZ LANDAZÁBAL



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA**

2011

ONTOGENIA DE LOS ESPORANGIOS Y ESPOROGÉNESIS DE *Lycopodium clavatum* L. y *Lycopodium thyoides* Humb. & Bonpl. ex Willd. (LYCOPODIACEAE)

LEIDY VIVIANA GÉLVEZ LANDAZÁBAL

Proyecto de grado

Director:

Edgar Javier Rincón Barón
Biólogo
Candidato a Doctor

Codirector:

Dagoberto Manuel Arrieta Prieto
Profesor Asociado
Universidad Industrial de Santander

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA**

2011

*A mis padres María Elcy y José Antonio,
por su gran amor y apoyo incondicional
para cumplir mis metas.*

AGRADECIMIENTOS

A Edgar Javier Rincón Barón y a Dagoberto Manuel Arrieta Prieto, gestores y directores de este proyecto.

Al profesor Andrés Torres y a Lyda Patricia Mosquera, de la Unidad de Microscopía de la Universidad de Cauca por su colaboración durante la pasantía.

A Cristina Rolleri (Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, Argentina), por facilitar material bibliográfico.

A Stella Frías (CVS Exploration) por su aporte financiero.

A María Fernanda Carreño y a Cesar Landazábal, por su colaboración durante la fase de campo.

A mis compañeros, especialmente a Helkin Forero y Yury Álvarez quienes fueron un gran apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A mis Padres José Antonio y María Elcy por su colaboración, dedicación y amor para salir adelante tanto a nivel profesional como personal

A mis hermanas Luz Dary y Diana por ser parte de mi vida y ayudarme siempre cuando más lo necesitaba.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	12
1. MARCO TEORICO.....	14
2. MATERIALES Y METODOS.....	20
2.1 Muestreo.....	20
2.2 Fijación, corte y coloración	20
2.3 Observación y análisis morfométrico.....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1 Descripción de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de <i>L. clavatum</i> y <i>L. thyoides</i>	22
3.2 Morfo metría de algunas estructuras asociadas al esporangio y las esporas de <i>L. clavatum</i> y <i>L. thyoides</i>	25
3.3 Pruebas histoquímicas.....	35
3.3.1 Identificación de mucopolisacáridos con la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS).....	35
3.3.2 Identificación de mucopolisacáridos sulfatados con la coloración de Azul de Alcian, contrastado con Hematoxilina de Harris.....	35
3.3.3 Identificación de calosa con la coloración de Azul de anilina, con microscopía de fluorescencia con filtro UV (Filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm).....	36
4. DISCUSION.....	39
5. CONCLUSIONES.....	48
6. RECOMENDACIONES.....	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	51

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Resumen estadístico de las medidas morfométricas de las células de la pared del esporangio, esporas, tétradas y pedicelo de <i>L. clavatum</i>	25
Tabla 2	Resumen estadístico de las medidas morfométricas de las células de la pared del esporangio, esporas, tétradas y pedicelo de <i>L. thyoides</i>	26
Tabla 3	Tabla 3. Probabilidades de la prueba de T Student para las medidas morfométricas de de las células de la pared del esporangio, esporas, tétradas y pedicelo de <i>L. clavatum</i> y <i>L. thyoides</i>	27

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figuras 1 y 2	Vista general de los estróbilos de <i>L. clavatum</i> y <i>L. thyoides</i> .	22
Figuras 3 - 6	Primeras etapas de la ontogenia del esporangio de <i>L. clavatum</i> .	27
Figuras 7 -10	Esporocitos maduros y estados meióticos de <i>L. clavatum</i> .	28
Figuras 11 - 16	Tétradas en diferentes etapas de maduración de <i>L. clavatum</i> .	29
Figuras 17 - 19	Esporas, células de la pared del esporangio y canales de mucílago de <i>L. clavatum</i> .	30
Figuras 20 - 23	Primeras etapas de la ontogenia del esporangio de <i>L. thyoides</i> .	31
Figuras 24 - 27	Esporocitos maduros y estados meióticos de <i>L. thyoides</i> .	32
Figuras 28 - 33	Tétradas en diferentes etapas de maduración de <i>L. thyoides</i> .	33
Figuras 34 - 36	Esporas, células de la pared del esporangio y canales de mucílago de <i>L. thyoides</i> .	34
Figuras 37 - 40	Identificación de mucopolisacáridos durante la esporogénesis de <i>L. thyoides</i> utilizando la tinción de PAS.	37
Figuras 41 - 44	Identificación de mucopolisacáridos durante la esporogénesis de <i>L. clavatum</i> utilizando la tinción azul de Alcian-hematoxilina.	38
Figuras 45 - 46	Observaciones de <i>L. thyoides</i> con fluorescencia, filtro UV de cortes en fresco y preparados en parafina, teñidos con azul de anilina para detectar la presencia de calosa.	39

RESUMEN

TITULO: ONTOGENIA DE LOS ESPORANGIOS Y ESPOROGÉNESIS DE *Lycopodium clavatum* L. y *Lycopodium thyoides* Humb. & Bonpl. ex W (LYCOPODIACEAE). *

AUTORA: LEIDY VIVIANA GÉLVEZ LANDAZÁBAL **

PALABRAS CLAVES: *Lycopodium*, Lycopodiaceae, ontogenia del esporangio, esporogénesis, histoquímica.

DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO: Los estudios sobre biología reproductiva de *Lycopodium* son escasos, por lo tanto, para las especies *L. clavatum* y *L. thyoides*, se estudiaron estos aspectos en especímenes recolectados en el municipio de California (Santander-Colombia) a 3100 m de altitud. Los estróbilos fueron procesados según las técnicas tradicionales para ser embebidos en parafina. Las secciones obtenidas (3-5 μm) fueron teñidas con safranina O-fastgreen, reactivo de Schiff, azul de Alcian y azul de anilina. Así mismo, fue teñido material fresco con aceto-orceína láctica. Las observaciones se efectuaron en un microscopio fotónico de alta resolución equipado con contraste diferencial de interferencia (DIC) y microscopio de fluorescencia. Los esporangios en las dos especies se localizan en la base de los esporófilos y se desarrollan de forma basípeta; el desarrollo inicia a partir de un grupo de células epidérmicas que se dividen formando dos estratos celulares. El estrato interno se diferencia en el tejido esporógeno que formará los esporocitos, los cuales experimentan meiosis I hasta la etapa de díada. Durante la meiosis se observan microtúbulos en disposición cuádrupolar. El proceso de meiosis termina con la formación de tétradas constituidas por esporas en disposición tetraédrica. El estrato celular externo dará origen a la pared del esporangio, de varios estratos celulares; de éstos, el más interno constituye el tapete secretor y el más externo desarrolla engrosamientos en las paredes anticlinales y la periclinal interna; los demás estratos celulares de la pared se degradan durante la maduración del esporangio junto con el tapete. Las esporas de las dos especies son reticuladas y con lesura trirrasgada. Durante todo el proceso se observó el desarrollo de canales de mucílago de origen lisogénico. El análisis histoquímico fue negativo para calosa y positivo para mucopolisacáridos y mucílago.

* Proyecto de Grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Edgar Javier Rincón Barón. Codirector: Dagoberto Manuel Arrieta Prieto.

ABSTRACT

TITLE: ONTOGENY OF SPORANGIA AND SPOROGENESIS OF *Lycopodium clavatum* AND *Lycopodium thyoides* (LYCOPODIACEAE)*

AUTHOR: LEIDY VIVIANA GELVEZ LANDAZABAL **

KEY WORDS: *Lycopodium*, Lycopodiaceae, sporangium ontogeny, sporogenesis, histochemistry.

CONTENT DESCRIPTION: Studies on reproductive biology of *Lycopodium* are scarce, therefore, for the species *L. clavatum* and *L. thyoides*, these aspects were studied in specimens collected in the municipality of California (Santander, Colombia) at 3100 m altitude. Strobili were processed using traditional techniques to be embedded in paraffin. The sections obtained (3-5 μm) were stained with safranin O- fastgreen, Schiff reagent, Alcian blue and aniline blue. Likewise, fresh material was stained with lactic aceto-orcein. The observations were made in a high resolution fotonic microscope equipped with differential interference contrast (DIC) and fluorescence microscope. The sporangia in two species are located at the base of the sporophylls and are developed in basipetal form; the development starts from a group of epidermal cells that are actively dividing to form two cell layers. The inner layer is differentiated in the sporogenous tissue that will form sporocytes, which undergo meiosis I until dyad stage. During meiosis are observed microtubules in quadripolar disposition. The process of meiosis ends with the formation of tetrads constituted by spores in tetrahedral arrangement. And the outer cell layer gives rise to the sporangia wall, of several cell layers; of these, the innermost is the secretory *tapetum* and the outermost developed thickenings in the anticlinal and inner periclinal walls; the other cellular layers of the wall are degraded during maturation of the sporangium along with *tapetum*. Spores of the two species are reticulates and with trilete lesure. During the whole process development of mucilage channels of lysogenic origin was observed. The histochemical analysis was negative for callose and positive for mucopolysaccharides and mucilage.

* Work Degree

** Santander Industrial University, Science Faculty, Biology School. Directress: Edgar Javier Rincón Barón. Codirectress: Dagoberto Manuel Arrieta Prieto.

INTRODUCCIÓN

Las Lycopodiáceas son plantas cosmopolitas, representadas por cuatro géneros: *Huperzia* Bernh., *Lycopodiella* Holub., *Phylloglossum* Kunze. y *Lycopodium* L., (Øllgaard 1992). Se reconocen aproximadamente 500 especies (Øllgaard 1992), ampliamente distribuidas en América, desde Alaska hasta la Tierra del Fuego (Tryon & Tryon 1982), siendo especialmente diversas en los Andes tropicales y subtropicales (Rolleri *et al.* 2010) y se encuentran desde el nivel del mar hasta 4500 m de altitud (Santa 1986). *Lycopodium* es un género con aproximadamente 40 especies, de las cuales ocho son neotropicales (Øllgaard 1992). En Colombia, *Lycopodium clavatum* L. y *Lycopodium thyoides* Humb. & Bonpl. ex Willd., se encuentran distribuidas en las tres cordilleras, la sierra nevada de Santa Marta, la serranía del Macuira y la serranía del Perijá, entre los 1000 y 4300 m de altitud; no se han registrado en la Amazonía y la Orinoquía (Murillo & Murillo 1999).

Se han realizado diversos estudios en licopodiáceas, desde estudios florísticos, revisiones taxonómicas y monografías, tales como los de Santa (1989), Tardieu-Blot (1971), Toursarkissian (1971), Rolleri (1971, 1975, 1978, 1981, 1984, 1985 a-b, 1989), Rolleri & Deferrari (1989), Øllgaard (1987, 1988, 1992, 1996), Tryon & Stolze (1994), Murillo & Harker (1990), Murillo & Murillo (1999); morfológicos, como los de Rolleri (1972 a-b), Rolleri & de la Sota (1972), Rolleri (1974, 1976, 1977 a-b, 1980), Rolleri *et al.* (2010), Øllgaard (1975), Rolleri & Deferrari (1986), Santa (1986), hasta citológicos, como los de Rolleri (1982 a-b), entre otros.

Sin embargo, los trabajos sobre la biología reproductiva de las licopodiáceas son escasos. Sikes (1908), 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 de la pared. 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*. Sérsic (1983 a-b), realizó un estudio detallado de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *Lycopodium saururus* Lam. (= *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis.), en el que realizó un análisis histoquímico para la detección de calosa, péptidos, lípidos, lignina, celulosa y carotenoides. Uehara & Kurita (1991), elaboraron el único estudio sobre la morfogénesis y ultraestructura de la pared de las esporas de *L. clavatum* e incluyeron algunos aspectos relacionados con la formación de las esporas. Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005), utilizando microscopía fotónica, describieron las esporas de 24 especies de *Huperzia*, cuatro de *Lycopodiella*, dos de *Lycopodium* y varios helechos que se encuentran en Colombia. Rincón *et al.* (2009) estudiaron la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de *Huperzia brevifolia* Holub, un trabajo detallado sobre la biología reproductiva de esta especie y el primero en su clase para el género. Finalmente, Rolleri *et al.* (2010) caracterizaron las esporas y los rasgos de la pared esporangial de *Huperzia reflexa* Lam. y *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm., en el contexto de un estudio morfológico de estas dos especies, citadas para el Noroeste de Argentina.

A pesar de que se cuenta con algunos trabajos sobre la biología reproductiva de *Lycopodium*, hasta el momento ninguno incluye una descripción detallada de la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis del género.

El presente trabajo describe y compara de manera detallada las características estructurales e histoquímicas de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *L. clavatum* y *L. thyoides*, aportando datos sobre el conocimiento de la biología reproductiva de las licopodiáceas de los Andes de Colombia. Los resultados se analizan comparativamente con otras especies de licopodiáceas, briófitos y pteridófitos homosporados.

1. MARCO TEORICO

Los Licófitos representan el grupo más antiguo de las plantas vasculares sin semillas que tienen representantes vivos. Constituyen un grupo de plantas, que se originó a mediados del Devónico, hace unos 400 millones de años y se han desarrollado de forma independiente del resto de las plantas vasculares (DiMichele & Skog 1992, Willis & McElwain 2002). Evolucionaron desde pequeñas plantas, hasta enormes árboles que dominaron los bosques y fueron especialmente abundantes y diversos en el carbonífero (Thomas 1992). Sin embargo, evidencia fósil muestra una disminución del número de individuos del grupo durante el cretácico (hace 140~75 millones de años) justo en el momento de la aparición de las angiospermas, seguido por una posterior diversificación durante este mismo periodo; esta situación pudo haberse presentado como un oportunismo ecológico, en el que la diversificación de los licófitos y helechos como los conocemos hoy en día, parece haber ocurrido después de la diversificación de las angiospermas (Schneider *et al.* 2004). Los Licófitos como grupo son antiguos pero la diversificación de las especies es reciente y se relacionan con procesos de orogenia de las cordilleras (Wikström *et al.* 1999, Wikström & Kenrick 2001, Sklenář *et al.* 2011).

En la actualidad existen alrededor de 1.200 especies en Licófitos organizados en tres familias, Lycopodiaceae, Selaginellaceae e Isoetaceae. Estas dos últimas sólo tienen un género representativo: *Selaginella* P. Beauv. con alrededor de 700 especies e *Isoetes* L. con cerca de 100 especies respectivamente (Moran 2008).

Las características más distintivas de los Licófitos es la disposición helicoidal de las hojas en el espiral sobre el vástago. Las hojas de los géneros vivientes son generalmente pequeñas y del tipo micrófilo, mientras que las de los géneros extintos son de un tamaño considerablemente mayor (Kaplan 2001, Tomescu 2009).

Los esporangios son de tipo eusporagio (originados de varias células meristemoides y forman una pared del esporangio con varias capas de celulares) (Nakazato *et al.* 2008), presentan forma arriñonada y se agrupan en los estróbilos (especies estrobiladas) o a lo largo del eje caulinar (especies no estrobiladas), ubicados sobre la cara adaxial de los esporófilos, en la porción basal o en las axilas que forman estos con el eje del estróbilo (Øllgaard 1987).

Dentro de los licófitos vivientes se encuentran dos géneros heterosporados: *Isoetes* y *Selaginella*, es decir, presentan dos tipos diferentes de esporas: macrosporas y microsporas. Sólo los pertenecientes al orden Licopodiales (*Huperzia*, *Lycopodiella*, *Phylloglossum* y *Lycopodium*) son homosporados (producen un solo tipo de esporas) (Øllgaard 1987, Nakazato *et al.* 2008).

Los estróbilos en *Lycopodium*, son erectos, simples o furcados, sésiles o pedunculados; los esporófilos presentan esporofilos u hojas protectoras de los esporangios, con disposición variable según la especie. Los esporófilos, por lo general, presentan una cavidad mucilaginoso que se encuentra a menudo en la parte basal sobre la cara abaxial. Los esporangios se encuentran sobre la base de los esporófilos y presentan un pedúnculo corto y grueso; las células epidérmicas del esporangio presentan paredes laterales delgadas, lignificadas y sinuadas (Rolleri 1972a, Øllgaard 1987, Moran & Riba 1995).

Los licófitos y monilófitos presentan un gradiente latitudinal de diversidad en donde la mayor riqueza de especies se localiza en las zonas tropicales. Ésta diversidad puede ser hasta 30 veces mayor a la presente en zonas templadas; este gradiente latitudinal de diversidad se cumple para la gran mayoría de helechos y licófitos, con algunas excepciones, como por ejemplo, para el género *Equisetum* L. (Moran 2008).

Las licopodiáceas constituyen una familia con amplia distribución en el mundo; se encuentran en zonas tropicales, subtropicales y templadas, desde el nivel del mar hasta 4500 m de altitud. La mayoría de las especies tropicales son epifitas,

mientras que las que crecen en los páramos son generalmente terrestres o saxícolas (Rolleri 1972a, Øllgaard 1988, Øllgaard 1992, Øllgaard 1996).

Según Murillo & Murillo (1999) en Colombia se han registrado 55 especies de las cuales 42 pertenecen al género *Huperzia*, 9 a *Lycopodiella* y 4 a *Lycopodium*; según estos autores el número de especies podría debido a que en este trabajo no se incluyeron 23 especies citadas en la literatura por la falta de material de referencia. La distribución de especies en Colombia está afectada por las tres cordilleras que atraviesan el país: en la cordillera Oriental se registran 38 especies y en la central 33 especies, en tanto, en la cordillera Occidental solo crecen 22 especies; de todas estas, solo 14 son comunes a las tres cordilleras (Murillo & Murillo 1999). En la región atlántica crecen 12 especies de licopodiácea, principalmente en la Sierra nevada de Santa Marta y en la Serranía de Macuira. En la región pacífica y la amazonía el número de especies disminuye a 7 y 11 respectivamente y en la Orinoquía solo se registran dos. No se ha registrado *Huperzia* en la Orinoquia y *Lycopodiella* en la región atlántica. De acuerdo a esto, Colombia es uno de los países con mayor diversidad de licopodiáceas, junto con Ecuador y Perú (Murillo & Murillo 1999).

En Colombia la riqueza de este componente florístico es importante (Rangel 2000) y más aún, cuando se considera a los páramos andinos como centros de endemismo y diversificación de estas especies (Øllgaard 1987, 1996).

Lycopodiaceae es una familia con caracteres poco diferenciables y por lo tanto presenta gran confusión al tratar de definir los taxones. Se ha dado importancia a características morfológicas externas como el tamaño de la hoja y el diámetro del tallo para separar especies (Murillo & Murillo 1999). Sin embargo, en la mayoría de los casos las características morfológicas externas son insuficientes y es necesario buscar otros caracteres que ayuden a aclarar esta situación.

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). De acuerdo a esto, Wilce (1972), determinó que los modelos de ornamentación de pared de las esporas son importantes para la segregación de los géneros. Foveolada, fusulada o foveolada /fusulada en *Huperzia* y *Phylloglossum*, rugulada o rugada en *Lycopodiella* y reticulada en *Lycopodium*. Estas características fueron confirmadas por Tryon & Lugardon (1991). Rolleri (1972a-b, 1974, 1975, 1976, 1977a-b, 1979, 1980, 1981) realizó aportes sobre la estructura 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 y la estructura de los márgenes de los microfílos para distinguir especies o grupos de especies. Øllgaard (1975) determinó que los engrosamientos característicos propios de las paredes de los esporangios tienen utilidad taxonómica, mientras que Rolleri (1979) los utilizó para diferenciar las especies del grupo *Lycopodium magellanicum* (Pal. Beauv.) Sw. y otras de los bosques húmedos de Argentina y Chile. Rolleri & Deferrari (1986) encontraron que los modelos epidérmicos no son influenciados por los factores ambientales y por consiguiente son útiles en la delimitación taxonómica; así mismo, comparó especies de *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis. ex “gondwánicas” encontrando poco o nada de variación en esta característica (Comunicación personal). Brown & Lemmon (1990) describieron las características de la esporogénesis en Bryophyta, aportando información sobre la biología reproductiva y la evolución de estas plantas. Tryon & Lugardon (1991) elaboraron un atlas palinológico, con detalles ultraestructurales de las esporas de Pteridophyta incluidas varias especies de *Huperzia*, destacando la importancia de la micrornamentación 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 vasculares y no 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 se conoce poco sobre la biología reproductiva (Rolleri 1972a, Uehara & Kurita 1991, Rincón *et al.* 2009, Rolleri *et al.* 2010)

Así mismo, son escasos los trabajos realizados donde se identifican metabolitos importantes en los procesos fisiológicos en licopodios. En algunos trabajos se concluyó que el almidón es la principal reserva energética en las estructuras vegetativas (Rolleri 1972a, Sersic 1983 a-b, Ibars *et al.* 1988). En otros estudios, se identificaron la presencia de mucílagos en estructuras reproductivas de *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Selaginella* (Bruce 1976, Bilderback 1987, Rolleri 1976).

La tinción con ácido periódico Schiff (PAS) es uno de los métodos histoquímicos empleados para la detección de polisacáridos simples, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, glucoproteínas o glucolípidos y polisacáridos (Jensen 1962, Lyon *et al.* 1991, Ruzin 1999). Para la detección de mucopolisacáridos también se emplean la tinción con azul de Alcian, la cual es más específica al detectar mucopolisacáridos sulfatados o fuertemente sulfatados dependiendo del pH del colorante. (Steedman 1950, Pearse 1985, Prentø *et al.* 1991, Ruzin 1999).

Por otra parte, la calosa es una de las sustancias importantes encontradas a nivel de la pared de los granos de polen en plantas superiores (Waterkeyn & Beinfait 1970, Stanley & Linskens 1974, Worrall *et al.* 1992, Bhatia & Malik 1996, Johri 1984, Peel *et al.* 1997, Tucker *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2002, Lu *et al.* 2003, Dong *et al.* 2005) y en el citoplasma y pared de las esporas de *Huperzia saururus* (Sérsic 1983a), la cual contribuye a los procesos de morfogénesis durante la reproducción. La calosa presenta fluorescencia amarillo verdosa brillante cuando se tiñe con azul de anilina y es observada con radiación ultravioleta (filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm). Aplicando esta técnica se podría

determinar si la calosa interviene durante la formación de las esporas en *Lycopodium*.

Los análisis histoquímicos son importantes porque permiten la identificación de sustancias específicas dentro de los tejidos y especular sobre características fisiológicas de una estructura en particular y la función de ésta durante los procesos de ontogenia de los esporangios y la esporogénesis (Ruzin 1999).

Los trabajos realizados que abarcan algunos aspectos de la biología reproductiva en licopodiáceas (Rolleri 1972a, Sérsic 1983a, Øllgaard 1987, Uehara & Kurita 1991, Rincón *et al.* 2009, Pita *et al.* 2006, entre otros) no incluyen descripciones estructurales e histoquímicas detalladas sobre la ontogenia de los esporangios y esporogénesis en *Lycopodium*. El presente trabajo describe de forma detallada la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis *L. clavatum* y *L. thyoides* aportando datos importantes al conocimiento de la biología reproductiva de dos especies de licopodiáceas de Colombia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo

Los ejemplares de *L. clavatum* y *L. thyoides* fueron recolectados a orilla de carretera, en la vereda Angosturas del municipio de California, Santander, Colombia¹ (7°21'06" N, 72°54'33" W) a 3100 m de altitud, durante el invierno de 2010. El material de soporte de este trabajo fue incluido en el Herbario de la Universidad Industrial de Santander (Herbario UIS) y en el Herbario de la Universidad del Valle (CUVC) Cali, con la referencia Gélvez-Rincón Lc 12 para *L. clavatum* y Gélvez-Rincón Lt 13 para *L. thyoides*.

2.2 Fijación, corte y coloración

Se tomaron diez estróbilos de distintas longitudes, de siete individuos diferentes para cada una de las especie. Posteriormente se fijaron en fragmentos de 1 cm en FAA (formaldehído, alcohol y ácido acético) durante 24 horas. El material fijado se deshidrató en la serie clásica de etanol (70%, 80%, 90%,95% y 100%) por cinco horas en cada cambio y 12 horas en etanol absoluto y se aclaró en dos pasos de cuatro y 12 horas en xilol (Ruzin 1999). Las muestras fueron embebidas en Paraplast (Mc Cormick®) durante 12 horas a 55°C y se cortaron a 3-5 µm de espesor con micrótomo rotatorio Spencer 820.

Los cortes fueron teñidos con safranina *O-fastgreen* (Johansen, 1940) para la descripción estructural; azul de anilina (pH 9.2), para observar calosa, la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS) para mucopolisacáridos y azul de Alcian (pH 2.5)-hematoxilina para mucopolisacáridos sulfatados y carboxílicos. Además, se realizaron montajes en fresco de los esporangios en diferentes etapas de maduración, los cuales fueron coloreados con aceto-orceína láctica por 3 horas, para la observación de los eventos de división celular y de estructuras que

¹ Según la Autoridad ambiental CDMB (Corporación Autónoma Regional para la defensa de la meseta de Bucaramanga), este trabajo no requiere permisos de recolección.

pueden perderse durante el procesamiento para la obtención de montajes permanentes.

2.3 Observación y análisis morfométrico.

Las observaciones se realizaron con un microscopio fotónico de alta resolución Nikon 80i Eclipse, equipado con contraste diferencial de interferencia (DIC) y un microscopio Nikon Eclipse e200 equipado con fluorescencia, utilizando filtro UV (filtro de excitación 365 nm y filtro barrera 420 nm). La fotodocumentación se realizó con cámara digital Nikon DS-2MV. La edición fotográfica se hizo con el programa NIS Elements versión 3.07 de Nikon² y las medidas se tomaron por medio del software Imagen-Pro Analyzer 6.3³ de Media Cybernetics, en la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca. Todo el procesamiento del material para corte se llevó a cabo en el Laboratorio de Histotécnia de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander y el material en fresco se preparó en la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca.

Se realizaron medidas de la longitud del eje ecuatorial de las esporas maduras, la longitud de las tétradas en posición radial y lateral, de los engrosamientos de las paredes anticlinales y periclinales de las células de la pared del esporangio y la medida del ancho y largo del pedicelo de esporangios maduros; Todas las medidas morfométricas tomadas son sugeridas por primera vez en este trabajo, excepto, las de la longitud del eje ecuatorial de las esporas (Traverse 2007). Estos datos fueron representados por la medida mínima, máxima, media y desviación estándar, utilizando el software Microsoft Excel 2007. Además, para las medidas morfométricas, se realizó una prueba T-Student para dos muestras independientes (*L. clavatum* y *L. thyoides*) con un valor de confianza del 95%, para rechazar o

^{2,3} Las licencias de los respectivos software fueron obtenidas por la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca.

aceptar la hipótesis nula (Media de *L. clavatum*= Media de *L. thyoides*), por medio del software Past (Hammer 2001).

3. RESULTADOS

3.1 Descripción de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *L. clavatum* y *L. thyoides*.

Los ejemplares analizados de *L. clavatum* y *L. thyoides* presentan estróbilos pedunculados (Figs. 1-2); los estróbilos maduros de *L. clavatum* alcanzan tamaños de $4,42 \pm 0,65$ cm de longitud, en tanto que, los estróbilos de *L. thyoides* miden entre $2,24 \pm 0,49$ cm de longitud. Los esporangios de las dos especies se localizan en la base de los esporófilos, maduran de forma basípeta a lo largo del estróbilo, es decir que los esporangios inmaduros se ubican en el ápice de los estróbilos y los maduros, en la base (Figs. 3 y 20).



Figuras 1-2. Estróbilos pedunculados de *L. clavatum* y *L. thyoides*, respectivamente. es: estróbilo; pd: pedúnculo.

El desarrollo de los esporangios se inicia a partir de un grupo de células epidérmicas, localizadas sobre la cara adaxial, en la base de los esporófilos (Figs. 4 y 21). Este grupo de células se dividen periclinal y anticlinalmente estableciendo dos capas de células de núcleos voluminosos, con granulación difusa, varios nucléolos y citoplasma escaso; en esta etapa tiene lugar una activa división celular, que determina la formación de un agregado indiferenciado de células con citoplasma comparativamente escaso (Figs. 5 y 22). En este agregado posteriormente se establecen dos grupos celulares bien definidos: un estrato interno, que formará el tejido esporógeno y uno externo que se diferenciará como pared del esporangio.

Las células del tejido esporógeno se encuentran densamente agrupados en el esporangio, presentan tamaños variables, contorno poligonal, núcleos grandes con varios nucléolos y citoplasma de aspecto granular (Figs. 6 y 23). Posteriormente, el esporangio queda constituido por la pared esporangial, el tapete y los esporocitos (Figs. 7 y 24); el tapete deriva del estrato interno de la pared del esporangio y los esporocitos, del tejido esporógeno.

Los esporocitos atraviesan distintas etapas durante la maduración. Esta etapa comienza con el aumento de volumen, se separan quedando libres en la cavidad del esporangio, adquieren forma esférica y están rodeados por la cubierta del esporocito. Estas células presentan citoplasma con grandes gránulos refringentes de diferentes tamaños y un núcleo en posición central; así mismo, se observa la acumulación de una capa a veces continua de material refringente entre la cubierta del esporocito y el esporocito (Figs. 8 y 25). Posteriormente, los esporocitos experimentan la primer etapa de la Meiosis, denominada Meiosis I, al final de la cual, alcanzan el estado de díada, sin pared celular que separe los núcleos de las futuras células hijas (Figs. 9 y 26); en esta etapa, es posible observar remanentes de las fibras del huso meiótico y la capa de material refringente se compacta alrededor de la diada y se internaliza entre las esporas en formación.

Durante la Meiosis II, se observaron células con microtúbulos en disposición cuadripolar (Figs. 10, 27 y 43). Estas células formarán una tétrada joven con esporas en disposición tetraédrica.

La cubierta de los esporocitos, en cortes permanentes no es tan evidente (Figs. 10 y 27). Sin embargo, en montajes en fresco y teñidos con aceto-orceína láctica, está cubierta se aprecia con claridad y se mantiene durante todo el proceso de esporogénesis. (Figs. 11-15 y 28-32).

En *L. clavatum* y *L. thyoides* las tétradas pasan por varias etapas de maduración, que se relacionan con el engrosamiento progresivo de las paredes de las esporas, la internalización del material refringente entre las tétradas de esporas y con el surgimiento del patrón de ornamentación reticulada (Figs. 11-16 y 28-33). Finalmente, las esporas con lesura trirrasgada son liberadas de la tétrada en la cavidad del esporangio. La medida del eje ecuatorial de las esporas fue de $66,59 \pm 0,89$ y $64,18 \pm 1,98$ para *L. clavatum* y *L. thyoides*, respectivamente. En *L. clavatum* y *L. thyoides*, las esporas presentan ornamentación reticulada en la cara proximal y distal (Figs. 17 y 34).

A medida que el esporangio madura, el tapete y las capas celulares adyacentes a éste degeneran progresivamente hasta desaparecer. En tanto, el estrato celular más externo de la pared desarrolla engrosamientos en las paredes anticlinales y periclinal interna, estableciéndose la pared definitiva del esporangio (Figs. 18 y 35).

Durante la maduración del estróbilo fue posible observar la formación de canales de mucílago, los cuales inician su desarrollo a partir de un grupo de células localizadas en la base de los esporófilos jóvenes, sobre la cara abaxial. Estos canales son de tipo lisogénico y se desarrollan a partir de la lisis de las células que los conforman (Figs. 19 y 36). En ninguna etapa del desarrollo se observó tejido vascular, ni células de transfusión asociadas a los esporangios.

3.2 Morfometría de algunas estructuras asociadas al esporangio y las esporas de *L. clavatum* y *L. thyoides*.

Los resultados de las medidas de *L. clavatum* y *L. thyoides* para las tétradas, las células de la pared del esporangio, el pedicelo y las esporas, se observan en las tablas 1 y 2. En cuanto al análisis con el estadístico T-Student se observó que todas las características morfométricas presentan una probabilidad muy baja ($p < 0.05$).

Tabla 1. Morfometría de las células de la pared del esporangio, esporas, tétradas y pedicelo de *L. clavatum*

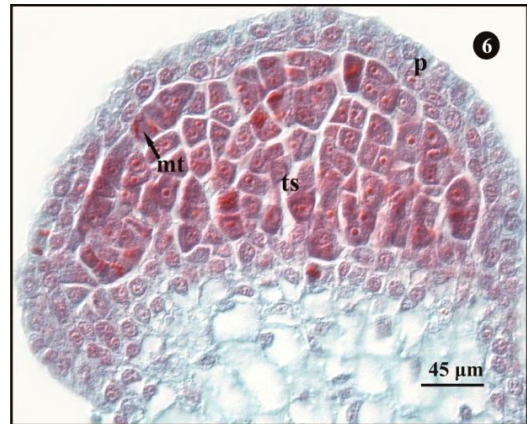
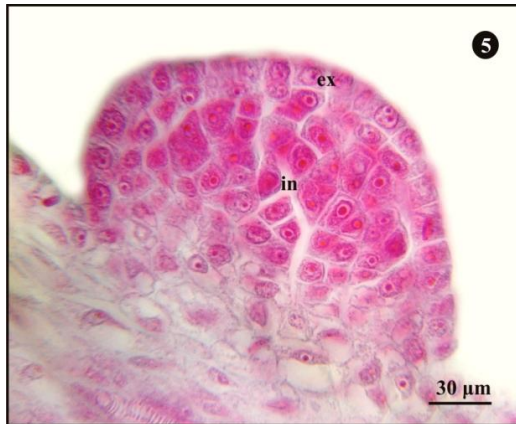
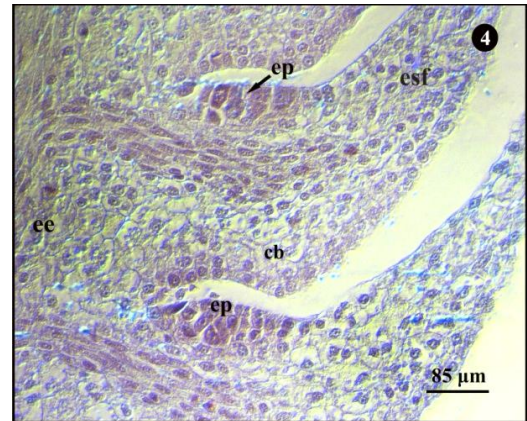
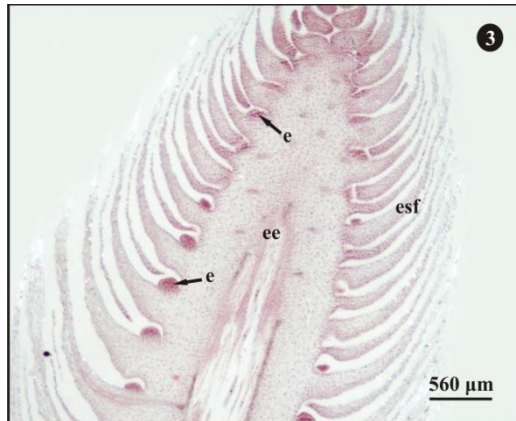
Medidas <i>Lycopodium clavatum</i> (μm) utilizando n=30		Medida Mínima	Medida Máxima	Media y desviación estándar
Células de la pared	Engrosamientos de las paredes anticlinales	7,9	12,75	9,47 \pm 1,00
	Engrosamientos de las paredes periclinales	3,58	5,1	4,43 \pm 0,45
Esporas	Cara proximal (eje ecuatorial)	65,32	69,46	66,59 \pm 0,89
Tétradas	Posición lateral	91,55	96,35	94.76 \pm 1.09
	Posición radial	83,67	91,53	88,53 \pm 1,46
Pedicelo de esporangios maduros	Ancho en posición sagital	324,58	369,24	352,50 \pm 12,16
	Largo en posición sagital	531,25	614,75	576,33 \pm 23,01

Tabla 2. Morfometría de las células de la pared del esporangio, esporas, tétradas y pedicelo de *L. thyoides*

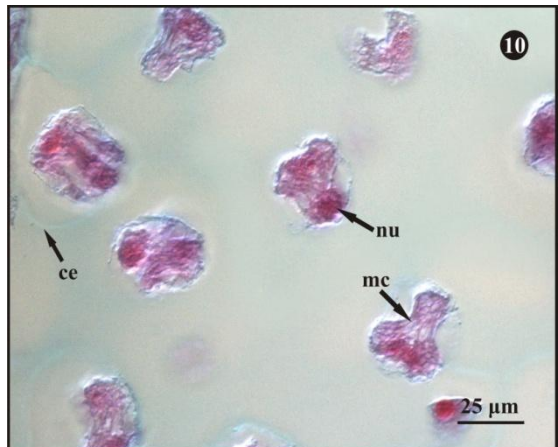
Medidas <i>Lycopodium thyoides</i> (µm) utilizando n=30		Medida Mínima	Medida Máxima	Media y desviación estándar
Células de la pared	Engrosamientos de las paredes anticlinales	5,14	9,22	6,71 ± 0,84
	Engrosamientos de las paredes periclinales	4,10	6,13	5,17 ± 0,70
Esporas	Cara proximal (eje ecuatorial)	60,16	67,03	64,18 ± 1,98
Tétradas	Posición lateral	93,12	98,64	95,33 ± 1,39
	Posición radial	70,68	75,85	74,34 ± 1,10
Pedicelo de esporangios maduros	Ancho en posición sagital	117,46	174,25	161,24 ± 9,86
	Largo en posición sagital	287,30	365,78	336.45 ± 19.89

Tabla 3. Probabilidades de la prueba de T Student para las medidas morfométricas de de las células de la pared del esporangio, esporas, tétradas y pedicelo de *L. clavatum* y *L. thyoides*

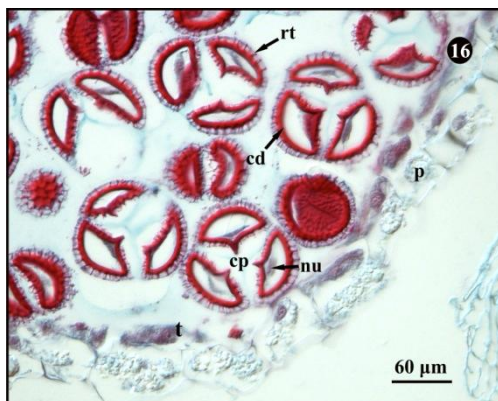
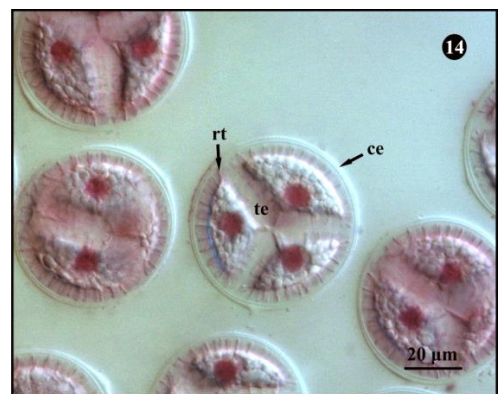
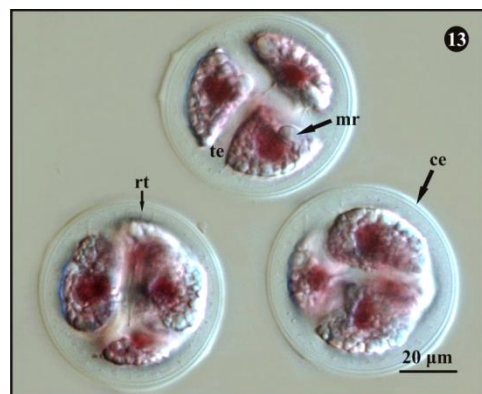
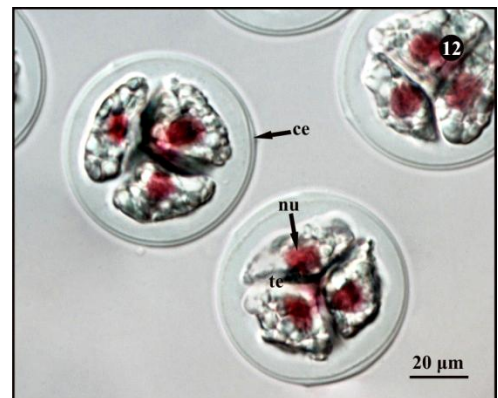
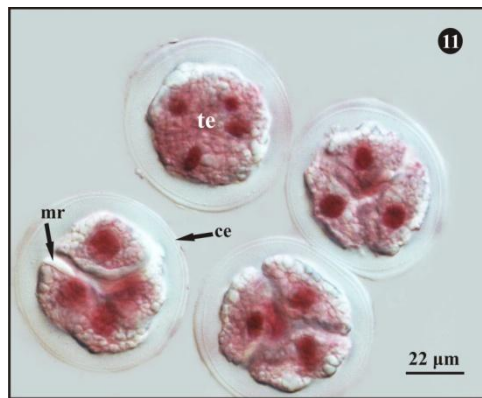
	Células de la pared		Esporas	Tétradas		Pedicelos	
	Engrosamiento de las paredes anticlinales	Engrosamiento de las paredes anticlinales	Cara proximal (eje ecuatorial)	Posición lateral	Posición radial	Ancho en posición sagital	Largo en posición sagital
Pr-T	$1.22 \cdot 10^{-16}$	$7.95 \cdot 10^{-6}$	$9.08 \cdot 10^{-8}$	0.0785	$2.22 \cdot 10^{-45}$	$1.31 \cdot 10^{-56}$	$8.36 \cdot 10^{-46}$



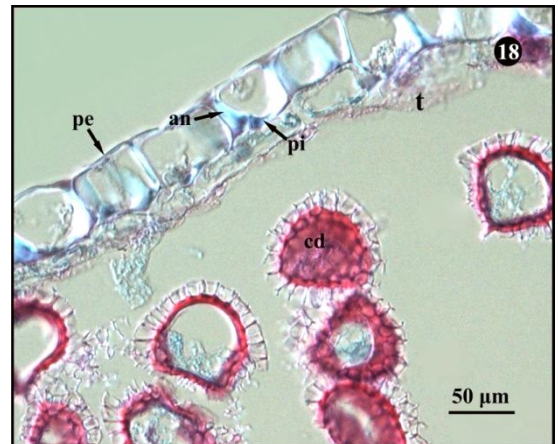
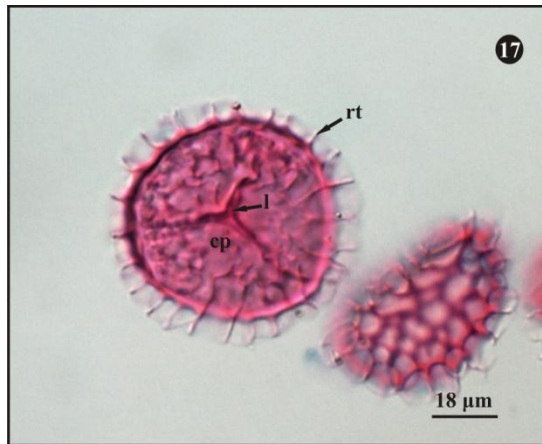
Figuras 3-6. Primeras etapas de la ontogenia del esporangio de *L. clavatum*. **3.** Corte longitudinal de la región apical del estróbilo. **4.** Desarrollo del esporangio, a partir de las células epidérmicas localizadas en la base de los esporófilos. **5.** Desarrollo del esporangio y formación del estrato celular interno y el externo. **6.** Esporangio con pared y tejido esporógeno; se observa el aumento en el número de células por activas mitosis. cb: canal basal de mucílago en formación; e: esporangio; ee: eje del estróbilo; ep: células epidérmicas; es: esporocito; esf: esporófilo; ex: estrato externo; in: estrato interno; mt: mitosis; p: pared del esporangio; ts: tejido esporógeno.



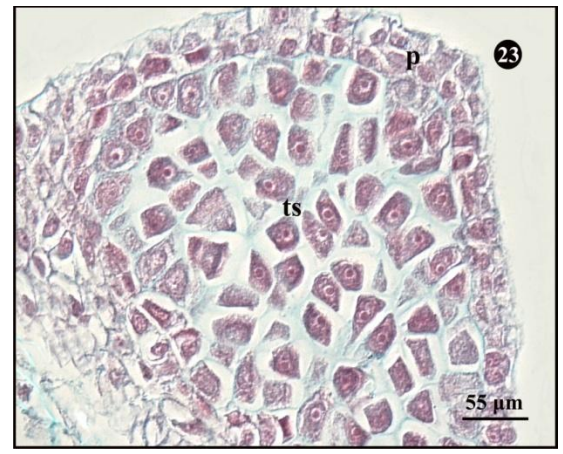
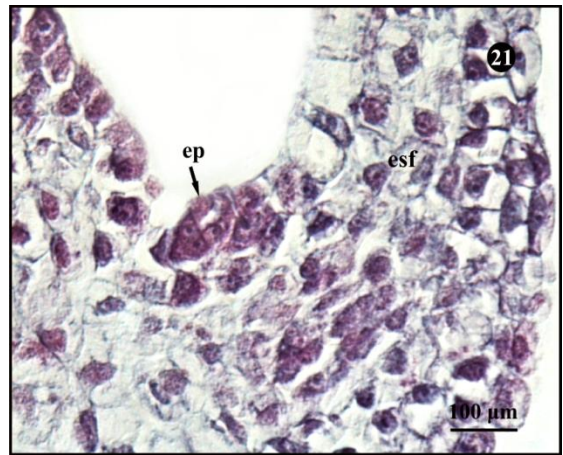
Figuras 7-10. Esporocitos maduros y estados meióticos de *L. clavatum*. **7.** Esporangio diferenciado con esporocitos, tapete y células de la pared. **8.** esporocitos premeióticos hinchados envueltos por su cubierta y rodeado por material refringente (montaje fresco teñidos con aceto-orceína láctica). **9.** Estado de diada al finalizar la meiosis I; se pueden observar las fibras del huso meiótico y la ausencia de pared entre los núcleos (montaje fresco teñidos con aceto-orceína láctica). **10.** Disposición cuadripolar de los microtúbulos durante la meiosis. ce: cubierta del esporocito; es: esporocito; fh: fibras del huso; mc: microtúbulos en disposición cuadripolar; mr: material refringente; nu: núcleo; p: pared del esporangio; t: tapete .



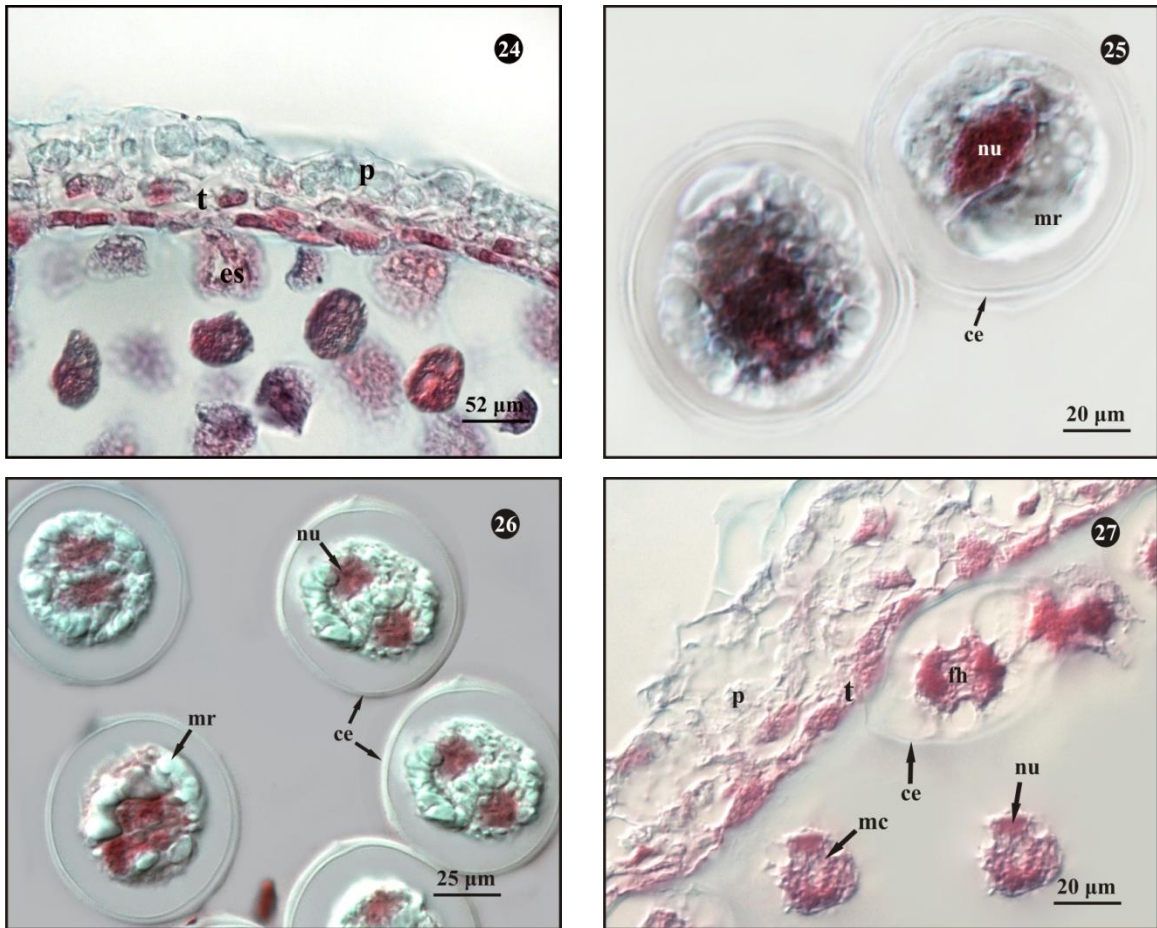
Figuras 11-16. Tétradas en diferentes etapas de maduración de *L. clavatum*. **11-15.** Tétradas en maduración (montajes frescos teñidos con aceto-orceína láctica); se observa el desarrollo progresivo de las paredes de las esporas y la formación del patrón de ornamentación reticulada; además se observa la cubierta del esporocito durante el desarrollo de las tétradas. **16.** Esporangio maduro donde se observa la degradación del tapete y las células internas de la pared del esporangio. cd: cara distal; ce: cubierta del esporocito; cp: cara proximal; nu: núcleo; p: pared del esporangio; rt: ornamentación reticulada; t: tapete; te: tétrada.



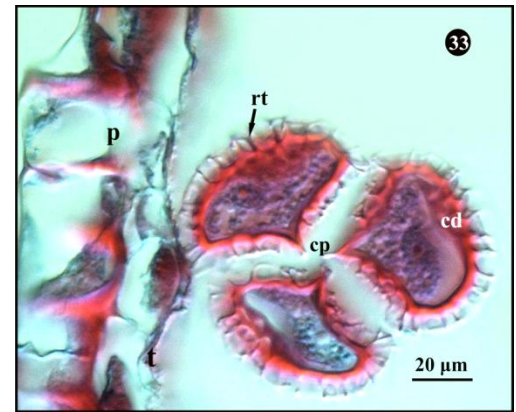
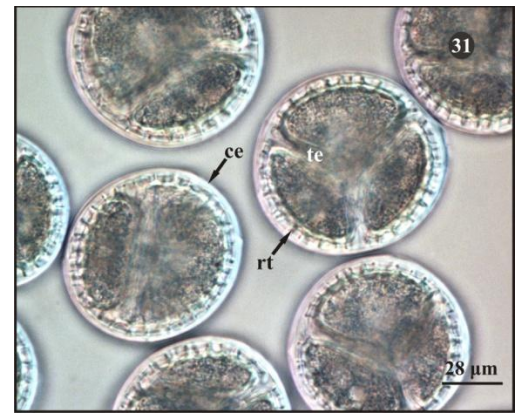
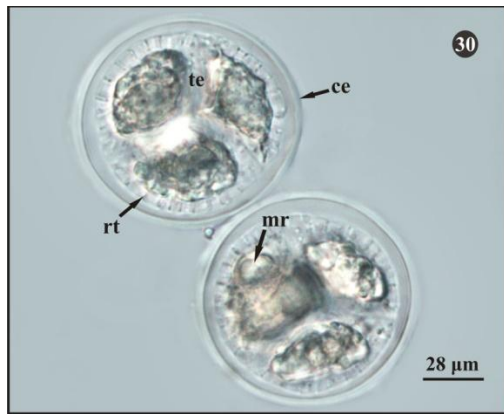
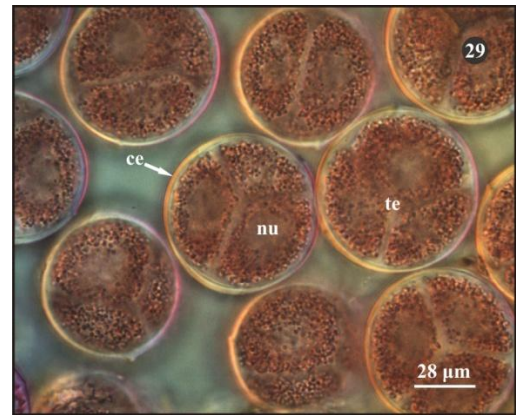
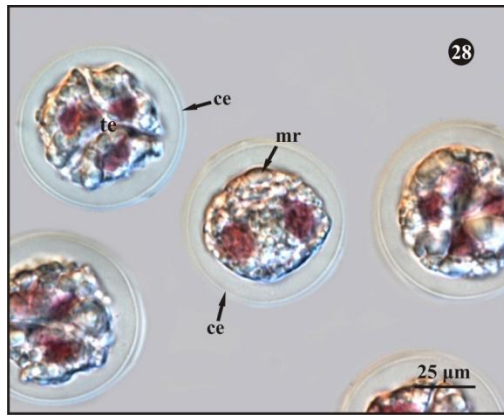
Figuras 17-19. Esporas, células de la pared del esporangio y canales de mucílago de *L. clavatum*. **17.** Esporas en vista proximal, ornamentación reticulada y lesura trirrsgada. **18.** Células de la pared del esporangio; se observa el engrosamiento de las paredes anticlinales y periclinar interna. **19.** Desarrollo de los canales de mucílago en la base de los esporófilos sobre la cara abaxial. an: paredes anticlinales; cb: canal basal de mucílago; cd: cara distal; cp: cara proximal; e: esporangio; ee: eje del estróbilo; l: lesura; pe: pared periclinar externa; pi: pared periclinar interna; rt: ornamentación reticulada; t: tapete.



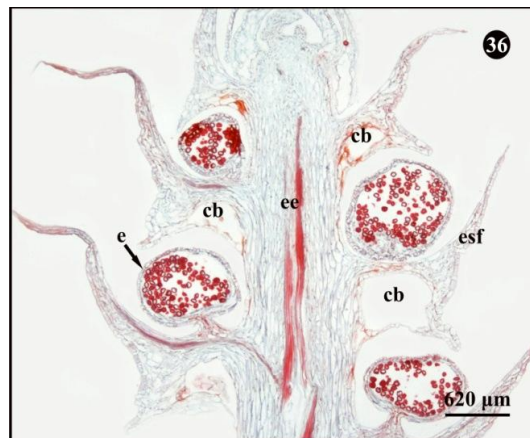
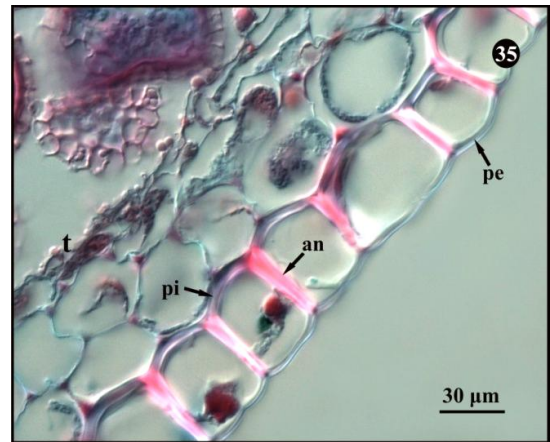
Figuras 20-23. Primeras etapas de la ontogenia del esporangio de *L. thyoides*. **20.** Corte longitudinal de la región apical del estróbilo. **21.** Desarrollo del esporangio, a partir de las células epidérmicas localizadas en la base de los esporófilos. **22.** Desarrollo del esporangio y formación del estrato celular interno y el externo; se observa el aumento en el número de células por activas mitosis. **23.** Esporangio con pared y tejido esporógeno. cb: canal basal de mucílago; e: esporangio; ee: eje del estróbilo; ep: células epidérmicas; esf: esporófilo; ex: estrato externo; in: estrato interno; p: pared del esporangio; ts: tejido esporógeno.



Figuras 24-27. Esporocitos maduros y estados meióticos de *L. thyoides*. **24.** Esporangio diferenciado con esporocitos, tapete y las células de la pared. **25.** Esporocitos premeióticos hinchados envueltos por su cubierta con presencia de material refringente (montaje fresco sin tinción con DIC). **26.** Estado de diada al finalizar la meiosis I; no se observa pared entre los núcleos (montaje fresco teñidos con aceto-orceína láctica). **27.** Disposición cuadrípolar de los microtúbulos durante la meiosis. ce: cubierta del esporocito; es: esporocito; fh: fibras del huso; mc: microtúbulos en disposición cuadrípolar; mr: material refringente; nu: núcleo; p: pared del esporangio; t: tapete.



Figuras 28-33. Tétradas en diferentes etapas de maduración de *L. thyoides*. **28-32.** Tétradas en maduración (montajes frescos observados con DIC); se observa el desarrollo progresivo de las paredes de las esporas y la formación del patrón de ornamentación reticulada; además se observa la cubierta del esporocito durante el desarrollo de las tétradas. **33.** Esporangio maduro donde se observa la degradación del tapete y las células internas de la pared del esporangio. cd: cara distal; ce: cubierta del esporocito; cp: cara proximal; nu: núcleo; p: pared del esporangio; rt: ornamentación reticulada; t: tapete; te: tetrad.



Figuras 34-36. Esporas, células de la pared del esporangio y canales de mucílago de *L. thyoides*. **34.** Esporas en vista proximal, con ornamentación reticulada en ambas caras y lesura trirrasgada. **35.** Células de la pared del esporangio; se observa el engrosamiento de las paredes anticlinales y periclinal interna. **36.** Desarrollo de los canales de mucílago en la base de los esporófilos sobre la cara abaxial. an: paredes anticlinales; cb: canal basal de mucílago; cp: cara proximal; e: esporangio; ee: eje del estróbilo; esf: esporófilo; l: lesura; pe: pared periclinal externa; pi: pared periclinal interna; rt: ornamentación reticulada; t: tapete.

3.3 Pruebas histoquímicas.

3.3.1 Identificación de mucopolisacáridos con la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS).

Se observó la presencia de mucopolisacáridos, en las diferentes etapas y estructuras implicadas en el proceso de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *L. clavatum* y *L. thyoides*. Durante las primeras etapas de diferenciación de los esporangios se observa la presencia de mucopolisacáridos en las células del estrato interno y externo que formarán el esporangio, principalmente en el citoplasma y las paredes celulares (Fig. 37). En esporangios más maduros se observa la presencia de mucopolisacáridos en la cubierta de los esporocitos, la cavidad del esporangio y están ausentes en el citoplasma de los esporocitos (Fig. 38). A medida que los esporocitos maduran y forman las tétradas después de la meiosis, se observa que los mucopolisacáridos disminuyen progresivamente en la cavidad esporangial observando la formación de vacuolas (Fig. 39); además, se detectó la presencia de estos mucopolisacáridos en las paredes de las tétradas. Posteriormente, en esporangios maduros la cavidad esporangial no presenta mucopolisacáridos, mientras que las paredes de las esporas, los restos del tapete y las células de la pared del esporangio son positivas (Fig. 40). En general, se observó que la coloración de PAS fue positiva para la mayoría de los tejidos presentes en el estróbilo; esto se debe a que esta coloración tiñe lignina y todo tipo de polisacáridos incluyendo celulosa y almidón, por tal razón, se debe tener cuidado en la interpretación de los resultados.

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

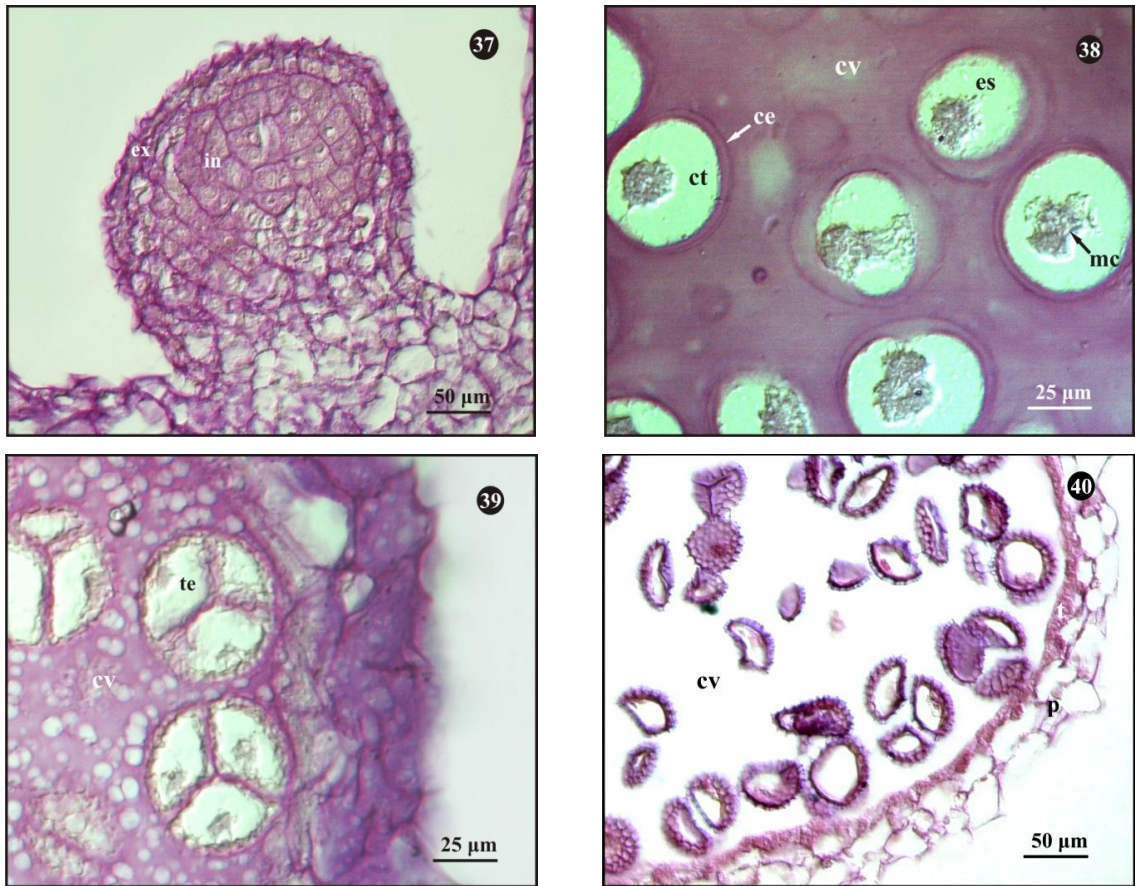
El comportamiento observado con los mucopolisacáridos sulfatados identificados con azul de Alcian, fue similar al observado para los mucopolisacáridos PAS positivo, excepto, que no se observó la vacuolización de estas sustancias en la

cavidad esporangial y que la pared de las esporas fueron negativas para estos mucopolisacáridos. Los mucopolisacáridos azul de Alcian positivo se acumulan en etapas tempranas de la ontogenia de los esporangios en las paredes y espacios entre las células del tejido esporógeno (Fig. 41 y 42). Así mismo, estos compuestos son abundantes en la cavidad del esporangio durante la formación de las tétradas y disminuyen progresivamente con la maduración del esporangio (Figs. 43 y 44).

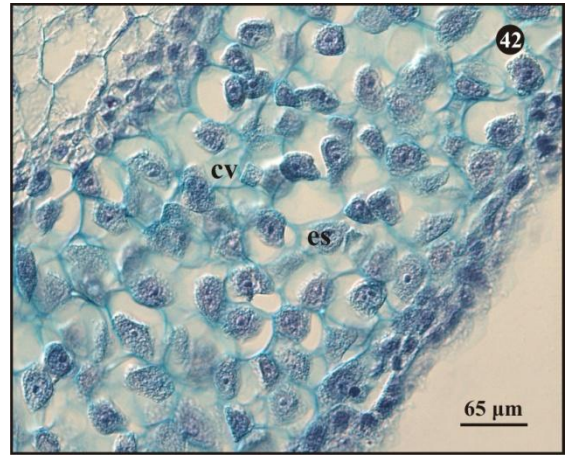
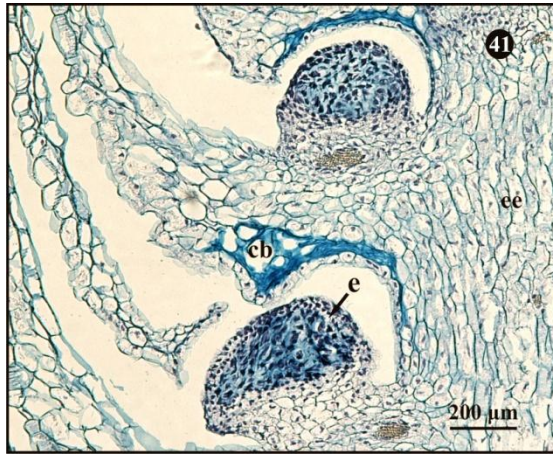
Además, se determinó que los mucopolisacáridos sulfatos son especialmente abundantes en los canales basales de mucílago en formación. Posteriormente, los canales de mucílago asociados con esporangios maduros colapsan y los mucopolisacáridos desaparecen (Fig. 41).

3.3.3 Identificación de calosa con la coloración de Azul de anilina, con microscopía de fluorescencia con filtro UV (Filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm).

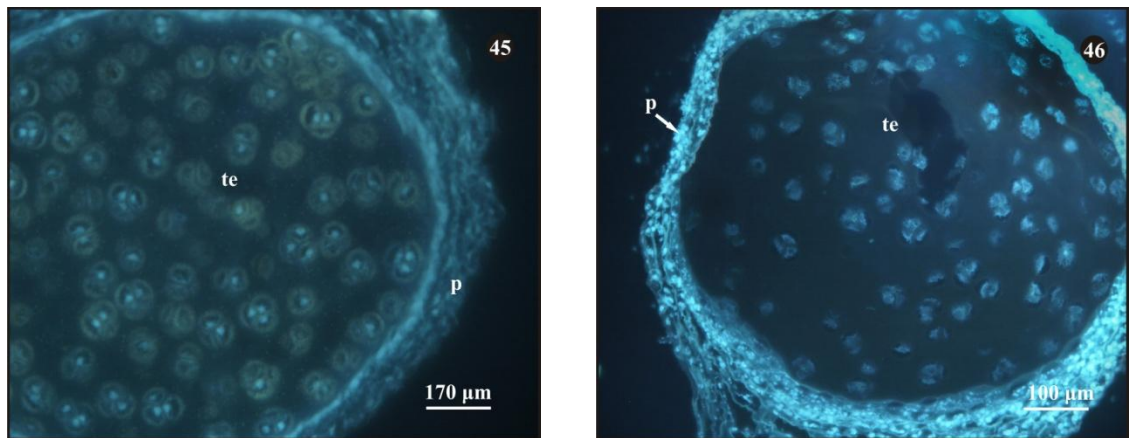
Las pruebas para calosa utilizando la coloración de azul de anilina resultaron negativas para las dos especies objeto de estudio. Los cortes permanentes sin azul de anilina (control) esporas y tétradas presentan coloración amarillo/rojizo en tanto que la pared del esporangio emite una coloración azul brillante (Fig. 45). Para los montajes con azul de anilina el comportamiento es similar (Fig. 46). Sin embargo esta fotografía muestra tétradas inmaduras por lo que la coloración amarillo/rojizo es menos evidente.



Figuras 37-40. Identificación de mucopolisacáridos durante la esporogénesis de *L. thyoides* utilizando la tinción de PAS. **37.** Se observa la presencia de mucopolisacáridos en las células del estrato interno y externo. **38.** A medida que los esporangios maduran se observa la acumulación de mucopolisacáridos en la cavidad del esporangio. **39-40.** En la cavidad de los esporangios maduros se observa la disminución gradual de los mucopolisacáridos, hasta desaparecer cuando las esporas maduran. ct: citoplasma; cv: cavidad del esporangio; ce: cubierta del esporocito; es: esporocitos; ex: estrato externa; in: estrato interna; mc: microtúbulos en disposición cuadripolar; p: pared del esporangio; t: tapete; te: tétrada.



Figuras 41-44. Identificación de mucopolisacáridos durante la esporogénesis de *L. clavatum* utilizando la tinción azul de Alcian-hematoxilina. **41-42.** Se observa como la coloración azul de Alcian positivo para mucopolisacáridos sulfatados (color azul intenso), se va acumulando en las etapas iniciales de la ontogenia de los esporangios. **43-44.** A medida que los esporangios maduran se observa una disminución gradual de los mucopolisacáridos sulfatados en la cavidad esporangial. cb: canal basal; ce: cubierta del esporocito; cv: cavidad del esporangio; e: esporangio; ee: eje del estróbilo; es: esporocitos; p: pared del esporangio; t: tapete.



Figuras 45-46. Observaciones de *L. thyoides* con fluorescencia, filtro UV de cortes en fresco y preparados en parafina, teñidos con azul de anilina para detectar la presencia de calosa. **45.** corte en parafina del esporangio sin tinción; se observa la emisión de luz azul brillante en las células de la pared del esporangio y coloración amarillo/rojizo en tétradas. **46.** Corte en parafina teñido con azul de anilina; se observa la ausencia de la coloración amarillo-verdosa, siendo negativa para la presencia de calosa. nu: núcleo, p: pared del esporangio, sa: espora, te: tétrada; p: pared del esporangio.

4. DISCUSIÓN

El desarrollo de los esporangios de *L. clavatum* y *L. thyoides* es basípeto, con esporangios maduros en la base del estróbilo y los inmaduros en la región apical; es decir, todas las etapas del desarrollo se observaron en un mismo estróbilo maduro. Esta condición también fue señalada por Rolleri (1972 a-b) y Uehara & Kurita (1991) para *L. clavatum*, Bruce (1974) para *L. carolinianum*, Øllgaard (1987) para *Phylloglossum* Kunze. y *Lycopodiella* Holub., Rincón *et al.* (2009) para *H. brevifolia* (Grev. & Hook.) Holub., Bravo *et al.* (en prep.)⁴ para *H. tetragona* (Hook. & Grev.) Trevis., Forero *et al.* (en prep.)⁴ para *L. cernua* y *L. descendens* B. Øllg., Dorado *et al.* (en prep.)⁴ para *H. phyllicifolia* (Desv. Ex Poir.) Holub. y Rincón *et al.* (en prep.)⁴ para otras especies de *Huperzia*, lo que sugiere alguna uniformidad en los géneros en cuanto a la ontogenia esporangial.

⁴ Referidos en preparación, citados anteriormente.

Rolleri (1972a), describió la morfología comparada de diferentes estructuras para algunas especies de *Lycopodium*. En este trabajo, incluyó detalles sobre la morfogénesis de los esporangios. Así mismo, la autora determinó que las células epidérmicas localizadas sobre la cara adaxial de los esporófilos darán origen a los esporangios, los cuales se dividen periclinalmente para producir dos capas de células: una basal, que originará el pedicelo y otra superficial que originará la pared del esporangio y el tejido esporógeno. Posteriormente, el esporangio se diferencia y aumenta de tamaño por activas divisiones periclinales y anticlinales. Esta situación también se evidenció en *L. clavatum* y *L. thyoides*. En algunas especies no estrobiladas la situación es similar, pero se ha encontrado que las células epidérmicas que darán origen a los esporangios, se localizan en las axilas entre los micrófilos y el eje caulinar (Rolleri 1972a, Øllgaard 1987, Rincón *et al.* 2009)

Durante la ontogenia de los esporangios de *L. clavatum* y *L. thyoides*, se observó que los esporocitos se diferencian a partir del tejido esporógeno y presentan una cubierta que permanece durante todo el proceso de esporogénesis llamada cubierta del esporocito ("*sporocite coat*"). Este término fue propuesto por Pettit & Jermy (1974), para designar la cubierta superficial que rodea los esporocitos de los pteridófitos en general. En *L. clavatum*, *L. thyoides* y otras especies de *Huperzia* y *Lycopodiella* (en preparación citados anteriormente), la cubierta de los esporocitos se mantiene durante todo el proceso de la esporogénesis. Estas observaciones contrastarían con las hechas por Rincón *et al.* (2009) quienes argumentaron que en la especie *H. brevifolia*, la cubierta de los esporocitos desaparecía liberándolos en la cavidad esporangial, justo al inicio de la meiosis. Es posible que las observaciones de estos autores se deban a un tipo artefacto de montaje producido por las técnicas empleadas durante la preparación del material. De esta manera, se concluye que la cubierta de los esporocitos en las licopodiáceas se mantiene durante todo el proceso de esporogénesis.

En *L. clavatum* y *L. thyoides* el tejido esporógeno se diferencia hasta la formación de los esporocitos premeióticos; este proceso se caracteriza por el hinchamiento y liberación de las células en el fluido de la cavidad esporangial, así como, el aumento de gránulos refringentes en el citoplasma celular. Este proceso también ha sido registrado en otros licopodios como *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009) y al parecer es un proceso universal dentro de las licopodiáceas, caracterizado por el aumento de sustancias de reserva como el almidón y principalmente de sustancias de naturaleza lipídica (en preparación citados anteriormente). Estos autores indican que la gran actividad metabólica de estas células se relaciona con el almacenamiento de sustancias de reserva y la producción de precursores que intervienen en la formación del esporoderma.

En *L. clavatum* y *L. thyoides* el proceso de meiosis es simultánea y por consiguiente, sin el desarrollo de una pared que separe los núcleos de la díada, una vez terminada la meiosis I. Este comportamiento es similar al observado en *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009) y en otras Licopodiáceas (en preparación citados anteriormente). Furness *et al.* (2002), determinaron que la meiosis simultánea es común en briófitos y pteridófitos. De igual forma, establecieron la relación de este tipo de división con los grupos de plantas que producen esporas triletes, en contraste, con los grupos de pteridófitos que producen esporas monoletes y que generalmente, presentan división sucesiva. Estos autores 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.

Durante la meiosis en *L. clavatum* y *L. thyoides*, se observó que los microtúbulos se disponen de forma cuatripolar. Esta disposición ha sido relacionada con el fenómeno de monoplastidia que se presenta durante los procesos de mitosis y meiosis de la mayoría de las criptógamas (Brown & Lemmon 1990a, Brown & Lemmon 1990b, Brown & Lemmon 1991b, Brown & Lemmon 1992, Brown & Lemmon 1997). La principal característica del fenómeno, radica en que dos plastidios orquestan el anclaje y el movimiento de los sistemas de microtúbulos del

huso, y que en el caso de la meiosis, determina la formación de una tétrada con esporas en disposición tetraédrica (Brown & Lemmon 1997, Pickett *et al.* 1999, Shimamura *et al.* 2004). En contraste, la poliplastidia es menos frecuente entre las criptógamas (Brown & Lemmon 1990b) y al parecer es la forma dominante en monilófitos, salvo algunas excepciones observadas en Maratiales (Brown & Lemmon 2001). En plantas superiores, la poliplastidia es la regla (Brown & Lemmon 1997). En relación a los licófitos, se ha determinado que las especies heterosporadas (Brown & Lemmon 1984, 1985, 1987 y 1989, Cleary *et al.* 1992a-b) y las homosporadas como *Lycopodium* (Uehara & Kurita 1991, Brown & Lemmon 1997) y *Lycopodiella* (Roy Brown comunicación personal) son monoplastídicas, en tanto que *Huperzia* es poliplastídica (Roy Brown com. pers.).

Aunque el sistema cuadripolar de microtúbulos, se relaciona con la monoplastidia, no es exclusivo, ya que se pueden encontrar grupos de plantas que sin ser monoplastídicas lo pueden desarrollar (Brown & Lemmon 2004). Sin embargo, al comparar dos especies monoplastídicas estrechamente relacionadas como es el caso de *Lycopodium* y *Lycopodiella* no es claro por qué este sistema de microtúbulos no fue encontrado en *L. cernua* y *L. descendes* (Forero *et al.* en preparación).

Rolleri (1972a) observó, en diferentes especies de *Lycopodium*, que la pared del esporangio está formada inicialmente por seis a siete capas con células de citoplasma granular y grandes nucléolos; en el curso del desarrollo, el número de capas parietales se reduce a cuatro. En contraste en *L. clavatum* y en *L. thyoides* solo se observaron de tres a cuatro capas: la más externa forma la pared definitiva del esporangio y la más interna, el tapete. Las capas intermedias se degradan junto con el tapete, a medida que madura el esporangio. Esta condición es similar a la encontrada para *L. clavatum* (Uehara & Kurita 1991) y *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009).

El estrato celular externo de la pared del esporangio de *L. clavatum* y *L. thyoides* presenta engrosamientos lignificados en forma de “U”, característica descrita por Øllgard (1975) para las licopodiáceas en general. Estos engrosamientos se desarrollan a medida que el esporangio madura y le confieren resistencia para contener el número creciente de esporas, que solo serán liberadas cuando maduren. Así mismo, es posible que faciliten su liberación, actuando como un resorte en la dispersión de las esporas. Como ocurre en la mayoría de los helechos (Slosson 1906, Bierhost 1971, Moran 2004) y en Licófitos heterosporados como *Selaginella* P. Beauv. (Koller & Scheckler 1986, Webster 1995, Schneller *et al.* 2008). Sin embargo, poco se sabe de estos mecanismos en licopodiales.

El tapete es una estructura omnipresente en plantas, se relaciona con los procesos de esporogénesis en briofitos y pteridofitos y en la microsporogénesis de gimnospermas y angiospermas; este puede ser secretor o plasmodial (Parkinson & Pacini 1995, Furness *et al.* 2002, Furness 2008). En *L. clavatum* y *L. thyoides*, el tapete es de tipo secretor, se origina a partir de la capa celular interna de la pared del esporangio y se mantiene hasta que finalmente se degrada cuando las esporas alcanzan la madurez. Según Pacini & Frenchi (1993) el tapete contribuye con los procesos de formación de esporas y granos de polen, con la generación de sustancias de reserva y con la formación de precursores biosintéticos del esporoderma y de la pared de los granos de polen (Lugardon 1990, Polowick & Sawhney 1993, Parkinson & Pacini 1995, Pacini 1997, Furness & Rudall 2001, Furness 2008); esta condición fue observada para *L. clavatum* (Uehara & Kurita 1991), para *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009) y para *L. cernua* y *L. descendens* (Forero *et al.* en prep). Teniendo en cuenta lo anterior, se presume que existe uniformidad ontogenética en cuanto a la formación y función del tapete. Por consiguiente, se asume que el tapete de *L. clavatum* y *L. thyoides*, cumple con las mismas funciones encontradas en otros grupos de plantas.

Los esporangios de *L. clavatum* y *L. thyoides* no presentan vascularización, al igual que lo observado por Rincón *et al.* (2009) en *H. brevifolia* y por Pita *et al.* (2006) en diez especies de *Huperzia* de Brasil. Estos últimos autores registraron la presencia de células parenquimáticas con paredes más delgadas comparadas con las demás células del tallo, que podrían cumplir con esta función. Sin embargo, en *L. clavatum* y *L. thyoides* no se encontraron este tipo de células.

Las esporas de *L. clavatum* y *L. thyoides* son similares en la micror ornamentación y es congruente a lo observado en otros estudios (Tryon & Lugardon 1991, Tryon & Stolze 1994, Solé de Porta & Murillo-Pulido 2005, Contreras *et al.* 2006). Sin embargo, según Rincón *et al.* (en prep.), existen pequeñas diferencias en cuanto a la distribución y densidad del retículo entre las dos especies: mientras que *L. clavatum* presenta un retículo más profundo en la cara distal y discontinuo en la proximal, en *L. thyoides* el retículo es más homogéneo entre las dos caras y este se torna discontinuo al aproximarse a la lesura.

Los análisis de los datos morfométricos, indican que las medidas que presentan menor variación fueron los engrosamientos de las paredes periclinales de los esporangios de *L. clavatum* y *L. thyoides*, datos que merecerían especial atención en posteriores estudios, ya que hasta momento no se ha encontrado en la literatura información con que contrastar. De la misma forma, merecen consideración, las medidas del eje ecuatorial de las esporas. Sin embargo, comparadas estas medidas con los resultados de Contreras *et al.* (2006), se observan algunas diferencias en cuanto a las medidas del eje ecuatorial de las esporas. Así mismo, Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005) registraron que la medida del eje ecuatorial de las esporas de *L. thyoides* varía entre 35 a 51 μm ; estos autores no incluyeron a *L. clavatum* en este estudio. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que las esporas de *L. clavatum* y *L. thyoides* presentan mayor tamaño; esta situación tal vez se deba a que, no se incluyó la medida del perisporio en los trabajos mencionados anteriormente y además, porque existe algún grado de variación que se ubica claramente dentro

de los límites de la especie. Finalmente, las medidas que presentaron mayor grado de variación en orden ascendente, fueron: las tétradas en posición lateral y el largo y ancho del pedicelo que sostiene el esporangio.

Las características morfométricas observadas utilizando el estadístico T-Student se observó que presentan una probabilidad muy baja ($p < 0.05$), indicando que *L. clavatum* y *L. thyoides* presentan diferencias significativas. Sin embargo, debido a que estas medidas son de tipo descriptivo, para hacer un estimado del valor taxonómico de estos caracteres, sería importante realizar un estudio más amplio que incluya un análisis multivariado, y de esta manera discernir qué tanto depende de factores ambientales y el grado de la variación intrínseca de cada especie.

En *L. clavatum* y *L. thyoides* se observaron canales basales de mucílago de origen lisogénico. Canales similares fueron descritos por Bruce (1976) y Rolleri (1976) en algunas especies de *Lycopodiella* y *Lycopodium*. De acuerdo con Bruce (1976) y estudios recientes en *L. cernua* y *L. descendens* (Forero *et al.* en prep), los canales de mucílago encontrados en estas especies también presentan desarrollo lisogénico. Ogura (1972) describe este tipo de canales en Marattiaceae. Así mismo, Morán (2008) menciona que esta sustancia se encuentra también en algunas especies de helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae. El mucílago encontrado en estos canales es azul de Alcian positivo, lo que indica que están constituidos principalmente por mucopolisacáridos sulfatados y carboxílicos. Bruce (1976) indica que estos mucílagos, pueden tener varias funciones en el estróbilo de las licopodiáceas, pero la más importante, es la retención de agua para favorecer el desarrollo de esporangios y protegerlos de la desecación. Dado el comportamiento del mucílago presente en estos canales para *L. clavatum* y *L. thyoides*, se presume que posiblemente, la principal función de los mucílagos en estas especies es evitar la desecación de aquellas células más susceptibles a la deshidratación, durante las etapas tempranas de la esporogénesis, ya que en otras especies de plantas estas sustancias cumplen una función similar (Bruce 1976, Pacheco *et al.* 2003, Majdoub *et al.* 2010, Ghanem *et al.* 2010). La

resistencia de las esporas maduras a la desecación y la capacidad de entrar en dormición, podrían soportar esta idea.

El comportamiento de los mucopolisacáridos neutros, sulfatados y carboxílicos durante la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de *L. clavatum* y *L. thyoides* es similar y congruente con el encontrado para otras licopodiáceas (en preparación citados anteriormente). Uehara & Kurita (1991) y Rincón *et al.* (2009) proponen que el paso de las sustancias desde el tapete a las esporas en formación, se podría dar a través del fluido presente en la cavidad del esporangio. Estos mucílagos podrían funcionar como biopolímeros retenedores de agua, capaces de mantener un ambiente acuoso a través del cual las sustancias de reserva o precursores de la pared de las esporas, serían exportados desde el tapete hasta las estructuras de disposición final. Así mismo, la retención de agua por el mucílago, protegería de la desecación a las células del tejido esporógeno, esporocitos y tétradas inmaduras. Una vez que el esporoderma se consolida, el mucílago en la cavidad esporangial desaparece, permitiendo que las esporas maduras se sequen y sean liberadas del esporangio.

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, Zhang *et al.* 2002, 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). Long (2003) determinó que la calosa está ausente durante el proceso de esporogénesis en anthocerotes. Esta condición es similar para *L. clavatum* y *L. thyoides*, así como, en otras licopodiáceas (en preparación, citados anteriormente). Por consiguiente, la similitud de los patrones de fluorescencia entre los controles y los tratamientos con azul de anilina obtenidos durante el proceso de esporogénesis en estas dos especies al ser iluminadas con luz ultravioleta, se explicaría por la

autofluorescencia emitida por las sustancias que conforman la pared de las esporas en formación, como la esporopolenina, que emite autofluorescencia amarillo/rojizo y la lignina, que presenta autofluorescencia azul brillante o azul-verdoso (Rost 1995, Ruzin 1999, Rolleri & Prada 2004).

5. CONCLUSIONES

En *L. clavatum* y *L. thyoides* es posible observar el desarrollo de los esporangios en un solo estróbilo debido a que estos maduran a lo largo de éste de forma gradual, es decir, es basípeta; como lo encontrado para otras especies de Lycopodiaceae, lo que sugiere una uniformidad en cuanto a la ontogenia esporangial.

Los procesos ontogenéticos de los esporangios y la esporogénesis de *L. clavatum* y *L. thyoides* son similares entre sí y con otras especies de Lycopodiaceae; esta situación ocurre posiblemente debido a que el desarrollo de caracteres reproductivos en licopodiáceas se encuentran ampliamente conservados.

La cubierta de los esporocitos de *L. clavatum* y *L. thyoides* se conserva durante todo el proceso de la esporogénesis y solo se pierde en el momento en el que maduran las tétradas y liberan las esporas en la cavidad esporangial, situación encontrada también para otras licopodiáceas.

La disposición cuadripolar de los microtúbulos observada durante la meiosis de *L. clavatum* y *L. thyoides* se relaciona con el tipo de división monoplastídica. Esta situación es de esperarse para todas las licopodiáceas que tengan este tipo de división.

Las medidas morfométricas que menor variación presentaron fueron los engrosamientos de las células de la pared de los esporangios. El comportamiento de las medidas morfométricas al comparar a *L. clavatum* y *L. thyoides*, se encontraron diferencias significativas que permiten diferenciar las dos especies.

El desarrollo de canales de mucílago en los estróbilos de *L. clavatum* y *L. thyoides* son de tipo lisogénico. El mucílago presente en estos canales y en la cavidad del esporangio, posiblemente retengan agua para prevenir la desecación en etapas de la esporogénesis susceptibles a padecerla.

Los mucopolisacáridos detectados con PAS y azul de Alcian cumplen varias funciones durante la esporogénesis. Estas sustancias actúan como biogeles que permiten la retención de agua, además, proporcionarían un medio acuoso para el transporte de sustancias nutricias y precursores del esporoderma desde el tapete hasta las esporas en formación y como sustancias de reserva durante algunas etapas de la esporogénesis.

Los resultados para la detección de calosa fue negativa para *L. clavatum* y *L. thyoides*, indicando que este compuesto no es importante en la génesis de la pared de las esporas, como se ha documentado para la microsporogénesis.

6. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se hace necesario fomentar la elaboración de trabajos sobre la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis en licófitos y de esta forma entender con mayor profundidad los procesos de evolución de este antiguo grupo 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 Lycopodiaceae 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?

BIBLIOGRAFIA

- ANGER, E. & M. WEBER. 2006. Pollen-wall Formation in *Arum alpinum*. *Ann Bot.* 97: 239–244.
- BHATIA, D.S. & C. P. MALIK. 1996. Significance of callose in reproduction of higher plants with special reference to male gametophyte. p. 221–240. *In* Malik, C.P. (Ed.), *Pollen-Spore Research Emerging Strategies. Advances in Pollen-Spore Research*, vol. 21. Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi.
- BIERHORST, D. 1971. *Morphology of vascular plants*. The Macmillan Company. Nueva York.
- BILDERBACK, D.E. 1987. Association of mucilage with the ligule of several species of *Selaginella*. *Amer. J. Bot.* 74: 1116-1121.
- BLACKMORE, S. 2007. Pollen and spores: Microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. *Plant. Systemat. Evol.* 263: 3-12.
- BLACKMORE, S., A.H. WORTLEY, J.J. SKVARLA, J.R. ROWLEY. 2007. Pollen Wall Development in Flowering. *New Phytol.* 3: 483-498.
- BROWN, R. C, & B, E. LEMMON. 1984. Plastid apportionment and preprophase microtubule bands in monoplastidic root meristem cells of *Isoetes* and *Selaginella*. *Protoplasma.* 123: 95-103.
- BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1985. A cytoskeletal system predicts division plane in meiosis of *Selaginella*. *Protoplasma* 127: 101-109.
- BROWN, R. C, & B, E. LEMMON. 1987. Division polarity, development, and configuration of microtubule arrays in bryophyte meiosis. I. Meiotic prophase to metaphase I. *Protoplasma* 137: 84-99.

BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1989. Morphogenetic plastid migration and microtubule organization during megasporogenesis in *Isoetes*. *Protoplasma* 152: 136-147.

BROWN, C. R & B, E. LEMMON. 1990a. Sporogenesis in bryophyta: p. 56-94. *In* S. Blackmore & R.B. Knox (eds). *Microspores: Evolution and ontogeny*. Academic Press, Londres, Inglaterra.

BROWN, C. R & B, E. LEMMON. 1990b. Monoplastidic cell division in lower land plants. *Amer. J. Bot.* 77: 559-571.

BROWN, R. C, & B, E. LEMMON. 1991. Plastid polarity and meiotic spindle development in microsporogenesis of *Selaginella*. *Protoplasma* 161:168-180.

BROWN, C. R & B, E. LEMMON. 1992. Polar organizers in monoplastidic mitosis of hepatics (Bryophyta). *Cell Motil. Cytoskel.* 22: 72-77.

BROWN, C. R & B, E. LEMMON. 1997. The quadripolar microtubule system in lower land plants. *J. Plant. Res.* 110: 93-106.

BROWN, C. R & B, E. LEMMON. 2001. The cytoskeleton and the spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma* 215: 35-49.

BROWN, C. R & B, E. LEMMON. 2004. γ -Tubulin, microtubule arrays, and quadripolarity during sporogenesis in the hepatic *Aneura pinguis* (Metzgeriales). *J. Plant Res.* 117: 371-376.

BRUCE, J. G. 1974. Comparative Studies in the Biology of *Lycopodium carolinianum*. *Amer. Fern. Soc.* 66: 125-137.

BRUCE, J. G., 1976. Development and distribution of mucilage canals in *Lycopodium*. *Amer. J. Bot.* 63: 481-491.

- CLEARY, A.L., BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1992a. Establishment of division plane and mitosis in monoplastidic guard cells of *Selaginella*. *Cell Motil. Cytoskel.* 23: 89-101.
- CLEARY, A.L., BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1992b. Microtubule arrays during mitosis in monoplastidic root tip cells of *Isoetes*. *Protoplasma* 167: 123-133.
- CONTRERAS, A. R., BOGOTÁ, A. & L. C. JIMÉNEZ. 2006. Atlas de las esporas de pteridófitos de Chipaque (Cundinamarca, Colombia). *Caldasia* 28: 327-357.
- DIMICHELE, W. A. & J.A SKOG. 1992. The Lycopsidea: a symposium, *An. Miss. Bot. Garden.* 79: 447-449.
- DONG, X., HONG, Z., SIVARAMAKRISHNAN, M., MAHFOUZ, M. & D.P VERMA. 2005. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 315-328.
- 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 microsporogenesis 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.
- GHANEM, M.E., R. HAN, B. CLASSEN , J. QUETIN-LECLERQ, 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.
- GRAUVOGEL-STAMM, L. & B. LUGARDON. 2009. Phylogeny and evolution of the horsetails: Evidence from spore wall ultrastructure. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 156: 116-129.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., AND P. D. RYAN, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

IBARS, A., VILAR, M., IRANZO, J., & A. SALVO. 1988. Sobre la distribución del almidón en las Lycopodiales. *Acta Botánica Malacitana*. 13: 141-150.

JENSEN, W.A. 1962. *Botanical Histochemistry. Principles and practice*. Edit Freeman, San Francisco, California, USA.

JOHRI, B.M. 1984. *Embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin.

JOHANNES ML, KLESSEN C. 1984. Alcianblue/PAS or PAS/Alcianblue? Remarks on a classical technique used in carbohydrate histochemistry. *Histochemistry* 80: 129-132.

JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill. Nueva York, EEUU.

KAPLAN, D.R. 2001. The science of plant morphology: definition, history, and role in modern biology. *Am. J. Bot.* 88: 1711-1741.

KOLLER, A. L. & S. E. SCHECKLER. 1986. Variations in microsporangia and microspore dispersal in *Selaginella*. *Amer. J. Bot.* 73: 1274-1288.

LONG, J. A. 2003. Ultrastructure and cytochemistry of sporogenesis in two bryophytes, *notothylas* and *takakia*. Tesis de maestria, Universidad Carbondale.

LYON, H., M.R. BARER, & E. SCHULTE. 1991. Staining involving covalent bonds. *In Theory and Strategy in Histochemistry*. H. Lyon, ed. Berlin, Springer-Verlag.

LU, S.Y., LI, Y.F., CHEN, Z.K. & J. X. LIN. 2003. Pollen development in *Picea asperata* Mast. *Flora* 198: 112-117.

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.

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., GABARAEVA, N.I., POLEVOVA, S.V., GRIGOR'EVA, V.V., KOSENKO, Y.V. & M.V. TEKLEVA. 2003. Development of Pollen Grain Walls and Accumulation of Sporopollenin. Russ J Plant Physiol. 50: 330-338.

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. New York.

MORAN R.C. & R. RIBA. 1995. en Davidse, G. D.; Sousa, M. & S. Knapp (eds.), Flora Mesoamericana, Psilotaceae a Salviniaceae, México, Tomo I.

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.

NAKAZATO, T., BARKER, M., RIESEBERG, L., & GASTONY, G. 2008. Evolution of the nuclear genome of ferns and lycophytes. p. 175-198. T.A. Ranker & C.H. Haufler (eds). Biology and Evolution of Ferns. Cambridge University Press, New York, USA.

OGURA, Y. 1972. Comparative Anatomy of the Vegetative Organs of Pteridophyta. GebrÄuder Borntraeger. Berlin.

- 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, Kew, Inglaterra.
- 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.
- PACINI, E. 1997. Tapetum character states: analytical keys form tapetum types and activities. *Can. J. Bot.* 75: 1448-1459.
- PACINI, E. & G. FRENCHI. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Syst. Evol.* 7: 1-11.
- PARKINSON, B.M & E. PACINI. 1995. A comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms. *Plant Syst. Evol.* 198: 55-88.
- PEARSE, A.G.E. 1985. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Vol.2. Analytic technology, 4th ed. Churchill Livinstone, New York, NY.
- PEEL, M.D., CAEMAN, J.G. & O. LEBLANC. 1997. Megasporocyte callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L., and weeping Lovegrass. *Crop Sci.* 37: 724-732.

- PETTITT, J. M & A.C JEREMY. 1974. The surface coats on spores. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 6: 245-257.
- 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.
- PICKETT, H., J.D., GUNNING, B.E., BROWN, R. C., LEMMON, B.E. & A. L. CLEARY. 1999. The cytoplasm concept in dividing plant cells: cytoplasmic domains and the evolution of spatially organized cell division. Am. J. Bot. 86: 153-172.
- POLOWICK, P.L. & V. K. SAWHNEY. 1993. Differentiation of the tapetum during microsporogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with special reference to the tapetal cell wall. Ann. Bot. 72: 595-905.
- PRENTØ, P., M.R. BARER, H. LYON, & E. HASSELAGER. 1991. Staining of macromolecules on the basis of charge. *In* Theory and Strategy of Histochemistry. H. Lyon, ed. Berlin, Springer-Verlag.
- 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.
- RENZAGLIA, K.S., R.J. DUFF, D.L. NICKRENT & D.J. GARBARY. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants; implications for a unified phylogeny. Philos Trans Ser B. 355: 769-793.
- RINCÓN, B. E. J., GÉLVEZ, L. L.V., FORERO, H. G., ARRIETA, P. D & 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.
- ROLLERI, C.H. 1971. Dos nuevas especies de *Lycopodium* (Lycopodiaceae-Pteridophyta) para el noroeste argentino. Darwiniana 16: 133-139.

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. s. str. Bol. Soc. Argent. Bot. 14: 365-369.

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. 1978. Dos nuevas especies de *Lycopodium* L. para los Andes tropicales. Hickenia 1: 142-148.

ROLLERI, C.H. 1979. Análisis morfológico y revisión sistemática de las especies andino patagónicas del género *Lycopodium* L., Lycopodiaceae-Pteridophyta. Physis (Buenos Aires), C, 38, 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. 1984. Notas nomenclaturales y taxonómicas en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L.: *L. cruentum* Spring. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 14: 45-63.

ROLLERI, C.H. 1985a. Notas nomenclaturales y taxonómicas en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L., II. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 14: 1-9.

ROLLERI, C.H. 1985b. Estudios morfológicos y sistemáticos en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 13:189-196.

ROLLERI, C.H. 1989. *Huperzia recurvifolia* Rolleri (Huperziaceae-Roth., Pteridophyta), una nueva especie de Brasil. Nat. Mus. La Plata N. S. Bot. 21: 209-213.

ROLLERI, C. H. 2008. Lycopodiaceae. En: F. O. Zuloaga, O. Morrone & M. J. Belgrano (eds.). Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, S de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay: 84-96. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 107. Missouri, Botanical Garden Press, Saint Louis, Missouri.

- ROLLERI, C.H. & A. 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. & 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. & PRADA, C. 2004. Endodermis foliares en el género *Isoetes* L. (Isoetaceae). Acta Botánica Malacitana 29: 191-201.
- ROLLERI, C. H., PRADA, C. & MARTÍNEZ, O. G. 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, NuevaYork, 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.
- SCHNEIDER, H., SMITH, A. R., CRANFILL, R., HILDEBRAND, T. E., HAUFLE, C. H. & T.A RANKER. 2004. Unraveling the phylogeny of polygrammoid ferns (Polypodiaceae and Grammitidaceae): exploring aspects of the diversification of epiphytic plants. Molec. Phylog. Evol. 31: 1041-1063.

- SHIMAMURA, M., BROWN, R. C., LEMMON, B. E., AKASHI, T., MIZUNO, K., NISHIHARA, N., TOMIZAWA, K-I., YOSHIMOTO, K., DEGUCHI, H., HOSOYA, H., HORIO, T. & Y. MINEYUKI. 2004. γ -Tubulin in basal land plants: characterization, localization and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell* 16: 45-59.
- SIKES, M.G. 1908. Notes on the morphology of the sporangium- bearing organs of the lycopodiaceae. *New Phytol.* 7: 41-60.
- SKLENÁŘ, P., DUŠKOVÁ, E., & H. BALSLEV. 2011. Tropical and temperate: evolutionary history of páramo flora. *Bot. Rev.* 77: 71-108.
- 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.
- 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.
- STANLEY, R.G. & H. F. LINSKENS. 1974. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. New York: Springer-Verlag.
- STEEDMAN, H.F. 1950. Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. *Quart.J. Micro, Soc.* 91: 477-479.
- 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.

TARDIEU-BLOT, M. L. 1971. Lycopodiacees (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.

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* 200: 256-263.

THOMAS, B. A. 1992. Paleozoic herbaceous lycopsids and the beginnings of extant *Lycopodium* sens. lat. and *Se laginella* sens. lat. *An. Miss. Bot. Garden.* 79: 623–631.

TOMESCU, A. 2009. Megaphylls, microphylls and the evolution of leaf development. *Trends Plant Sci.* 14: 5-12.

TOURSARKISSIAN, M. 1971. Las lycopodiaceae del noroeste de Argentina estudio sistemático y anatómico. *Ann. Acad. Bras. Ciencias.* 43: 191-207.

TRAVERSE, A. 2007. Paleopalynology. *Paleopalynology, Second Edition.* Springer, Dordrecht, The Netherlands.

TRYON, R. & A. TRYON. 1982. Ferns and allied plants with special reference to tropical America. Springer, Nueva York, EEUU.

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. & STOLZE, R.G. 1994. Pteridophyta of Peru. Part VI. 22. Marsileaceae-21. Isoetaceae. *Fieldiana Botany N. S.* 34: 1-190.

TUCKER, M.R., PAECH, N.A., WILLEMSE, M.T.M. & A. M. KOLTUNOW. 2001. Dynamics of callose deposition and β -1,3- glucanase expression during reproductive events sexual and apomictic *Hieracium*. *Planta* 212: 487–498.

- UEHARA, K & S. KURITA.1991. Ultrastructural study on spore wall morphogenesis in *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae). *Am. J. Bot.* 78: 24-36.
- WATERKEYN, L., & A. BEINFAIT.1970. On a possible function of the callosic special wall in *Ipomoeapurpuea* (L.) Roth. *Grana* 10: 13-20.
- WEBSTER T.R. 1995. Demonstrating spore dispersal in the spikemoss, *Selaginella martensii*. *Am. Biol. Teacher.* 57: 83-86.
- WIKSTRÖM, N., KENRICK, P., & M. CHASE. 1999. Epiphytism and terrestrialization in tropical *Huperzia* (Lycopodiaceae). *Plant Syst. Evol.* 218: 221-243.
- WIKSTRÖM, N., & P. KENRICK. 2001. Evolution of Lycopodiaceae (Lycopsidea): estimating divergence times from *rbcL* gene sequences by use of nonparametric rate smoothing. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 177-186.
- WILCE, J. H. 1972. Lycopod spores, I. General spore patterns and the generic segregates of *Lycopodium*. *Amer. Fern J.* 62: 365-79.
- WILLIS, K. J & J, C. MCELWAIN. 2002. The evolutions of plants. Oxford University Press.
- WORRALL, D., HIRD, D.L., HODGE, R., PAUL, W., DRAPER, J. & R. SCOTT. 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4: 759-771.
- ZHANG, C., GUINEL, F.C. & B.A. MOFFATT. 2002. A comparative ultrastructural study of pollen development in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and male-sterile mutant Apt1-3. *Protoplasma* 219: 59-71.