

Ontogenia de los esporangios, formación y citoquímica de esporas en licopodios (Lycopodiaceae) colombianos

Edgar Javier Rincón Baron^{1, 2}, Cristina Hilda Rolleri³, Fernando Alzate Guarín¹ & Jacinta Mireya Dorado Gálvez⁴

1. Grupo de Estudios Botánicos y Docentes del Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, calle 67 No. 53 -108, Medellín, Colombia; ejrbaron@gmail.com, alzatef@gmail.com
2. Grupo Ecología y Diversidad Vegetal, Departamento de Biología, Calle 13 N° 100-00, Universidad del Valle, Sede Meléndez, Cali, Colombia.
3. Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática (LEAVES), Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 64 N° 3 e/119 y 120 La Plata B1904 DZB, Buenos Aires, Argentina; tinar.cris@gmail.com
4. Departamento de Biología. Carrera 2 N° 1A-25, Urbanización Caldas, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia; jacintadorado@gmail.com

Recibido 14-V-2013. Corregido 20-IX-2013. Aceptado 24-X-2013.

Abstract: Ontogeny of the sporangium, spore formation and cytochemistry in Colombian Lycopodials (Lycopodiaceae). Studies on reproductive aspects of Lycopodiaceae are not very abundant in the scientific literature, and constitute essential information to support taxonomic and systematic relationships among the group. Here we present a detailed study of the ontogeny of sporangia and sporogenesis, and the chemical determination of several compounds generated during spore formation. The analyses were performed in 14 taxa of six genera of the family, *Diphasiastrum*, *Diphasium*, *Huperzia* (a genus which is treated here including *Phlegmariurus*), *Lycopodiella*, *Lycopodium* and *Palhinhaea*. Specimens were collected in three departments from the Colombian Andes between 1 454-3 677m altitude. Ontogeny was studied in small, 1cm long pieces of strobili and axis, which were fixed in glutaraldehyde or FAA, dehydrated in alcohol, embedded in LR White, sectioned in 0.2-0.5µm and stained with toluidine blue (TBO), a metachromatic dye that allows to detect both sporopollenin and lignin or its precursors, during these processes. For other studies, paraplast plus-embedded sections (3-5µm) were stained with safranin-fast green and alcian blue-hematoxylin. Chemical tests were also conducted in sections of fresh sporangia at different stages of maturity using alcian blue (mucopolysaccharides), Lugol solution (starch), Sudan III (lipids), phloroglucinol (lignin) and orcein (chromosomes). Sections were observed with photonic microscope equipped with differential interference contrast (DIC) and fluorescence microscopy (for spore and sporangium walls unstained). Strobili and sporangia were dehydrated with 2.2 dimethoxypropane, critical point dried and coated with gold for scanning electron microscopy (SEM). Our results indicated that the ontogeny of sporangia and sporogenesis were very similar to the previously observed in *Huperzia brevifolia*. Cutinisation occurs in early stages of development of sporangium cell walls, but in their final stages walls become lignified. As for the sporoderm development, the exospore is the first layer formed, composed by sporopollenin. The endospore deposits as a thin inner layer composed of cellulose, pectin and carboxylated polysaccharides. The perispore, if present, deposits at last. Mucopolysaccharides were found on the sporocyte coat and its abundance in sporangial cavity persists up to the immature tetrads stage, and then disappears. The lipids were abundant in the sporocytes, tetrads and spores, representing the main source of energy of the latter. In contrast, starch is not detected in the spores, but is abundant in premeiotic sporocytes and immature tetrads, developmental stages of high cellular metabolic activity. Intrinsic fluorescence corroborates the presence of lignin and cutin in the sporangium wall, while the sporopollenin is restricted to the exospore. The transfusion cells and the perispore are not always present. However, the processes of ontogeny and sporogenesis are extremely similar throughout the taxa studied, suggesting that they represent conservative family traits, nonspecific or generic. Rev. Biol. Trop. 62 (1): 273-298. Epub 2014 March 01.

Key words: cutin, lignin, lipids, Lycopodiaceae, sporogenesis, sporopollenin, starch.



Los Licófitos incluyen individuos heterospóricos, agrupados en los órdenes Isoetales y Selaginetales, e individuos homospóricos, reunidos en el orden Lycopodiales. Actualmente se los trata en conjunto como un grupo monofilético, diferente de los helechos o monilófitos debido a la presencia de microfilos, espermatozoides biflagelados y una inversión en el orden de algunos genes en el ADN de los cloroplastos que resulta similar al que se halla en briófitos, mientras que los megafilos, los espermatozoides pluriflagelados y la presencia de una inversión génica de 30Kb en una región del genoma del cloroplasto son caracteres compartidos por los monilófitos (Kenrick & Crane, 1997; Wikström & Kenrick, 1997, 2001; Renzaglia, Duff, Nickrent & Garbary, 2000; Yatsenyuk, Valiejo, Samigullin, Wilkström & Troitsky, 2001; Smith, Pryer, Schuettpelz, Korall & Schneider, 2006).

La familia Lycopodiaceae es cosmopolita y reúne aproximadamente 450 especies que crecen desde el nivel del mar hasta más de 4 000m de altitud. Arana & Øllgaard (2012) mencionan 190 especies para Sudamérica, mientras que para Colombia, se reconocen 78 especies distribuidas en todo el país con excepción de la Orinoquía (Murillo, Murillo, León & Triana, 2008). La familia fue subdividida por Wagner & Beitel (1992, 1993) en tres subfamilias: Huperzioideae Wagner & Beitel, que reúne individuos diploides y tetraploides (con números cromosómicos basados en $x=33, 34, 36, 38, 42$); Lycopodielloideae Wagner & Beitel, que agrupa los individuos presumiblemente diploides (con números cromosómicos basados en $x=35, 55$ y 78) y Lycopodioideae Wagner & Beitel, en la que se registran números cromosómicos que incluyen $n=30, 34, 32, 36$ y también $n=90$ y 92 (éstos sólo en individuos de *Lycopodium*).

En las últimas décadas se han generado numerosos aportes y la clasificación ha variado, aunque los cambios más destacables están relacionados con la interpretación de los taxones de nivel genérico. Holub (1964, 1975, 1983, 1985, 1991) segregó los géneros *Austrolycopodium* Holub, *Diphasiastrum* Holub,

Lycopodiastrum Holub, *Lycopodiella* Holub, *Pseudodiphasium* Holub, *Pseudolycopodiella* Holub, *Pseudolycopodium* Holub, *Lateristachys* Holub y agregó *Phlegmariurus* (Herter) Holub, a los previamente reconocidos *Diphasium* C. Presl ex Rothm., *Huperzia* Bernh., *Lycopodium* L., *Palhinhaea* Vasc. & Franco y *Phylloglossum* Kunze. Tryon & Tryon (1982) aceptaron dos géneros: *Lycopodium*, dividido en subgéneros y *Phylloglossum*, que posteriormente Christenhusz, Zhang & Schneider (2011) incluyeron en *Huperzia*. Øllgaard (1987, 1990, 1992) y Øllgaard & Windisch (1987) reconocieron *Huperzia*, *Lycopodium* y *Lycopodiella* en el Neotrópico, aunque subdivididos en grupos formales o informales más o menos coincidentes con los géneros propuestos por Holub (1964, 1975, 1983, 1985, 1991). Posteriormente, Haines (2003), propuso los géneros *Dendrolycopodium* Haines y *Spinulum* Haines y más recientemente, Øllgaard (2012 a, b), con base de las propuestas de Holub (1964, 1975, 1983, 1985, 1991), Wagner & Beitel (1992, 1993) y estudios moleculares de Wikström & Kenrick (2000, 2001), aceptó las tres subfamilias y segregó 16 géneros, nueve de los cuales citó para el Nuevo Mundo: *Huperzia* y *Phlegmariurus* (Huperzioideae), *Lycopodiella*, *Pseudolycopodiella* y *Palhinhaea* (Lycopodielloideae), *Lycopodium*, *Diphasiastrum*, *Diphasium* y *Austrolycopodium* (Lycopodioideae), sin considerar *Dendrolycopodium* ni a *Spinulum* (Haines, 2003)

Otros estudios sobre las Lycopodiaceae, diversos en temas y enfoques, incluyen los trabajos de Rolleri (1972 a, b, 1975, 1979, 1980, 1981), Rolleri & Deferrari (1986), Whittier & Webster (1986), Santa (1986), Øllgaard (1975, 1987, 1988, 1992, 1996), Murillo & Harker (1990), Tryon & Stolze (1994), Murillo & Murillo (1999), Whittier (1998, 2003, 2006), Pita, De Menezes & Prado (2006) y Rolleri, Prada & Martínez (2010). Las primeras descripciones sobre la estructura y organización de los esporangios en Lycopodiaceae fueron realizadas por Sykes (1908). Wilce (1972) describió las esporas de *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Huperzia*, proponiendo grupos basados en

la ornamentación, Øllgaard (1975) y Rolleri (1979) estudiaron la estructura y el modelo epidérmico de la pared del esporangio de las especies incluidas hasta ese momento en *Lycopodium*, resaltando la importancia de estos caracteres en la sistemática. Sersic (1983) describió la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis., con datos sobre la dinámica de compuestos como almidón, lípidos, calosa, lignina y pectinas en el proceso. Uehara & Kurita (1991) estudiaron el desarrollo y ultraestructura de la pared de las esporas de *Lycopodium clavatum* L. e incluyeron aspectos de la esporogénesis. Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005) describieron las esporas de 30 especies de Lycopodiaceae, Gola (2008) analizó estrategias reproductivas y ontogenia de los esporangios en *Huperzia*, Wellman, Gensel & Taylor (2009) estudiaron la ontogenia y ultraestructura de la pared de la spora de licófitos fósiles y la compararon con la de la especie actual *Lycopodium clavatum* L. Por su parte, Rincón, Gélvez, Forero, Arrieta & Hleap (2009) describieron la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis en *H. brevifolia* (Grev. & Hook.) Holub y, finalmente, Devi & Singh (2011) aportaron datos adicionales sobre la morfología de los esporangios y esporas en especies de *Huperzia*.

Este trabajo describe la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis en especies de seis géneros de la familia Lycopodiaceae que crecen en Colombia. Los autores consideran que para entender de forma clara y precisa las relaciones taxonómicas y sistemáticas dentro de la familia Lycopodiaceae, se requiere un mayor conocimiento y mejor evaluación de los caracteres diagnósticos anatómicos específicos así como de otros provenientes de la morfología esporal y la citología, analizar los límites de las especies, los presuntos híbridos y las especies de origen híbrido. Por esas razones, se han reconocido aquí, para los efectos de este estudio, los géneros *Diphassium*, *Diphasiastrum*, *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Palhinhaea*, pero no la segregación sugerida para *Huperzia* (Øllgaard 2012a, b), que se trata aquí incluyendo *Phlegmariurus*. Los taxones incluidos son los

siguientes: *Diphassium jussiaei* (Desv. ex Poir.) Rothm., *Diphasiastrum thyoides* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Holub, *Huperzia arcuata* B. Øllg., *Huperzia attenuata* (Spring) Trevis., *H. brevifolia*, *Huperzia crassa* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Rothm., *Huperzia reflexa* (Lam.) Trevis., *Huperzia firma* (Mett.) Holub, *Huperzia phyllicifolia* (Desv. ex Poir.) Holub, *Huperzia rosenstockiana* (Herter) Holub, *Huperzia tetragona* (Hook. & Grev.) Trevis., *Lycopodiella andicola* B. Øllg., *Lycopodium clavatum* y *Palhinhaea cernua* Franco & Vasc. Se analiza la presencia, momento de aparición e importancia de varios compuestos, tales como almidón, cutina, lignina, esporopolenina, mucopolisacáridos, y lípidos, durante estos procesos. Se detallan las etapas de la meiosis, con aportes de datos originales sobre la biología reproductiva de las Lycopodiaceae en general.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 14 taxones de seis géneros de Lycopodiaceae presentes en Colombia: nueve especies de *Huperzia* y una de cada género en el caso de *Diphasiastrum*, *Diphassium*, *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Palhinhaea*. Las localidades de recolecta, altitud y las referencias de herbario de las especies estudiadas se incluyen en el cuadro 1. Los especímenes se determinaron utilizando claves y material bibliográfico disponible (Øllgaard, 1987, 1988, 1992; Øllgaard com. pers.), colecciones tipo y materiales de herbario. Los especímenes fueron depositados en los herbarios de la Universidad del Valle (CUVC) y de la Universidad de Antioquia (HUA).

Para estudios de ontogenia esporangial y esporogénesis, se tomaron 30 estróbilos o tallos portadores de esporangios en el caso de especies sin estróbilo definido para cada uno de los taxones estudiados, y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato, pH 7.2 y 0.2M durante 24-48hr a 6°C. Luego de la fijación, las muestras se lavaron en el mismo buffer y con agua destilada. Se deshidrataron durante una hora en cada etapa de la serie de etanol y durante 12hr en etanol al 100% a 6°C

CUADRO 1
Especies estudiadas y localidades de recolección

TABLE 1
List of species studied and collection sites

| Especie | Localidad | Altitud (m) | Colección testigo |
|----------------------------------|-----------------|-------------|-------------------|
| <i>Diphasium jussiaei</i> * | Cauca | 3 404 | E.J. Rincón 0008 |
| <i>Diphasiastrum thyoides</i> *♦ | Cauca | 3 376 | E.J. Rincón 0009 |
| <i>Huperzia arcuata</i> *♦ | Caldas | 3 677 | E.J. Rincón 0004 |
| <i>Huperzia attenuata</i> | Cauca | 3 404 | E.J. Rincón 0010 |
| <i>Huperzia brevifolia</i> *♦ | Cauca | 3 404 | E.J. Rincón 0011 |
| <i>Huperzia crassa</i> *♦ | Caldas | 3 677 | E.J. Rincón 0012 |
| <i>Huperzia reflexa</i> | Valle del Cauca | 1 950 | E.J. Rincón 0013 |
| <i>Huperzia firma</i> | Cauca | 3 376 | E.J. Rincón 0014 |
| <i>Huperzia phyllicifolia</i> *♦ | Cauca | 3 376 | E.J. Rincón 0015 |
| <i>Huperzia rosenstockiana</i> * | Caldas | 3 677 | E.J. Rincón 0003 |
| <i>Huperzia tetragona</i> * | Cauca | 3 404 | E.J. Rincón 0016 |
| <i>Lycopodiella andicola</i> | Valle del Cauca | 1 950 | E.J. Rincón 0005 |
| <i>Lycopodium clavatum</i> * | Cauca | 3 404 | E.J. Rincón 0007 |
| <i>Palhinhaea cernua</i> *♦ | Valle del Cauca | 1 454 | E.J. Rincón 0006 |

* Ejemplares seleccionados para la descripción de la ontogenia esporangial y esporogénesis.

♦ Ejemplares seleccionados para la descripción de las determinaciones químicas.

y se embebieron en etanol-resina LR White (London Resin®, UK), a 6°C efectuándose varios cambios de resina pura durante seis días, en constante agitación. La resina fue polimerizada a 60°C por 24hr. Se obtuvieron secciones de 0.2-0.5µm con cuchillas de vidrio en ultra micrótopo Leica®, que se colorearon con azul de toluidina (TBO) en bórax al 1%, pH 3.6 por 30-60s. Con estos preparados se hicieron las descripciones sobre la ontogenia de los esporangios y esporogénesis. El TBO en condiciones de metacromasia permite distinguir las paredes celulósicas primarias con polisacáridos carboxilados y ácido péctico, de cutina, lignina y esporopolenina, en la pared de los esporangios y en el esporoderma de las esporas en desarrollo o adultas (Southworth, 1973).

Otros 30 estróbilos o tallos portadores de esporangios se fijaron en una mezcla de formol, etanol y ácido acético (FAA) por 24-48hr a 6°C, se cortaron en fragmentos de 2cm de longitud, se deshidrataron en la serie gradual de alcoholes y xilol (Ruzin, 1999) y se incluyeron

en paraplast plus (Mc Cormick®) durante 12hr a 55°C. Se obtuvieron secciones longitudinales y transversales con micrótopo rotatorio Spencer 820, a 3-5µm, que se colorearon con azul de alcían-hematoxilina con el fin determinar la presencia de mucopolisacáridos asociados al proceso de esporogénesis y con safranina-verde rápido para descripciones adicionales.

En esporangios no fijados y en diferentes etapas de maduración, se utilizó Sudán III para determinar la presencia de lípidos, solución de Lugol para almidón, azul de alcían para mucopolisacáridos, fluoroglucinol para lignina y orceína para poner en evidencia la dinámica de las figuras meióticas, todo lo anterior siguiendo los protocolos propuestos por Ruzin (1999).

Para llevar a cabo las descripciones morfológicas con MEB el material se fijó en glutaraldehído y se deshidrató en 2.2 dime-toxipropano y se efectuó el desecado a punto crítico con un desecador SAMDRI®-795. Los estróbilos y los esporangios se montaron sobre cinta conductiva de carbono de doble cara y se

recubrieron con oro en una ionizadora DENTON VACUUM DESK IV durante 5min, y se observaron con un JEOL JSM-6490LV.

Las secciones se examinaron con un microscopio fotónico Nikon 80i eclipse® equipo con el sistema de contraste diferencial de interferencia (CDI) y esporangios en fresco con microscopio Nikon 90i eclipse® con los aditamentos de fluorescencia, empleando filtro UV-2A (filtro de excitación 330-380nm y filtro barrera 420nm) para la determinación de fluorescencia intrínseca de cutina, lignina y esporopolenina (Ruzin, 1999). Las fotografías se obtuvieron con cámara digital Nikon DS-2MV® utilizando 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.

En el curso del estudio, realizado se comprobó que los taxones seleccionados presentan un comportamiento similar durante la ontogenia de los esporangios y esporogénesis, así como similar respuesta a las determinaciones químicas efectuadas. Por ello, para la descripción pormenorizada de los procesos se eligieron las especies que suministraron las mejores ilustraciones para cada caso. La terminología utilizada para las descripciones, se encuentra en Lellinger (2002), el término cubierta de los esporocitos se usa según Pettitt & Jeremy (1974) y Rincón et al. (2009).

RESULTADOS

Los esporangios maduros de las Lycopodiaceae se distribuyen helicoidalmente sobre los ejes, protegidos por expansiones laminares (esporofilos) que forman estróbilos definidos, diferentes de los trofofilos o bien se disponen en áreas caulinares en las que trofofilos no se diferencian morfológicamente o apenas se distinguen unos de otros (Fig. 1 A, B, C, D, E y F). En estos últimos casos, los ejes completos actúan fisiológicamente como un estróbilo y los esporangios se encuentran en toda su extensión.

Los esporangios se originan en la axila de trofofilos o sobre la cara adaxial de esporofilos

jóvenes cerca del sitio de inserción de estos al eje del estróbilo. A medida que los esporofilos maduran, los esporangios pueden mantener su posición o desplazarse y quedar ubicados cerca de la axila o en la zona medial del esporofilo. En *Huperzia* los esporangios son axilares (Fig. 1 A y B); en *Lycopodium*, *Diphasium* y *Diphasiastrum* se localizan cerca del sitio de inserción de los microfilos (Fig. 1 C y D); en *Lycopodiella* y *Palhinhaea* se ubican sobre la cara adaxial de los esporofilos.

El esporangio es un eusporangio, con una cápsula y un pedicelo. La cápsula es reniforme, tiene pared múltiple y un área de dehiscencia, que es poco evidente en *Lycopodiella* y *Palhinhaea* (Fig. 1 E y F), y se une al tejido epidérmico del eje o de los microfilos mediante un pedicelo más o menos grueso y relativamente corto. Los pedicelos más cortos se observaron en *Lycopodiella* y *Palhinhaea* y son comparativamente más largos en *Huperzia*, *Lycopodium*, *Diphasium* y *Diphasiastrum*.

Ontogenia de los esporangios: Independientemente de su relación con microfilos o ejes, los esporangios maduran basípetamente, de modo que los más jóvenes se encuentran siempre en el ápice de los tallos o estróbilos y los maduros en la base (Fig. 2 A).

Los esporangios inician su desarrollo a partir de un grupo de células epidérmicas situadas en un área del eje, próxima a la zona de emisión de los esporofilos (Fig. 2 B). Este grupo de células forma, por mitosis, un agregado de células indiferenciadas con citoplasma relativamente escaso, de granulación difusa, núcleos grandes y varios nucléolos. La diferenciación de estas células determina el establecimiento de dos estratos celulares: uno externo que dará origen a la pared del esporangio y uno interno que formará el tejido esporógeno y el pedicelo (Fig. 2 C). Las células del tejido esporógeno se encuentran densamente agrupadas en el esporangio, tienen contornos poligonales, núcleos grandes con varios nucléolos y citoplasma de aspecto granular y son capaces de experimentar abundantes mitosis (Fig. 2 D).

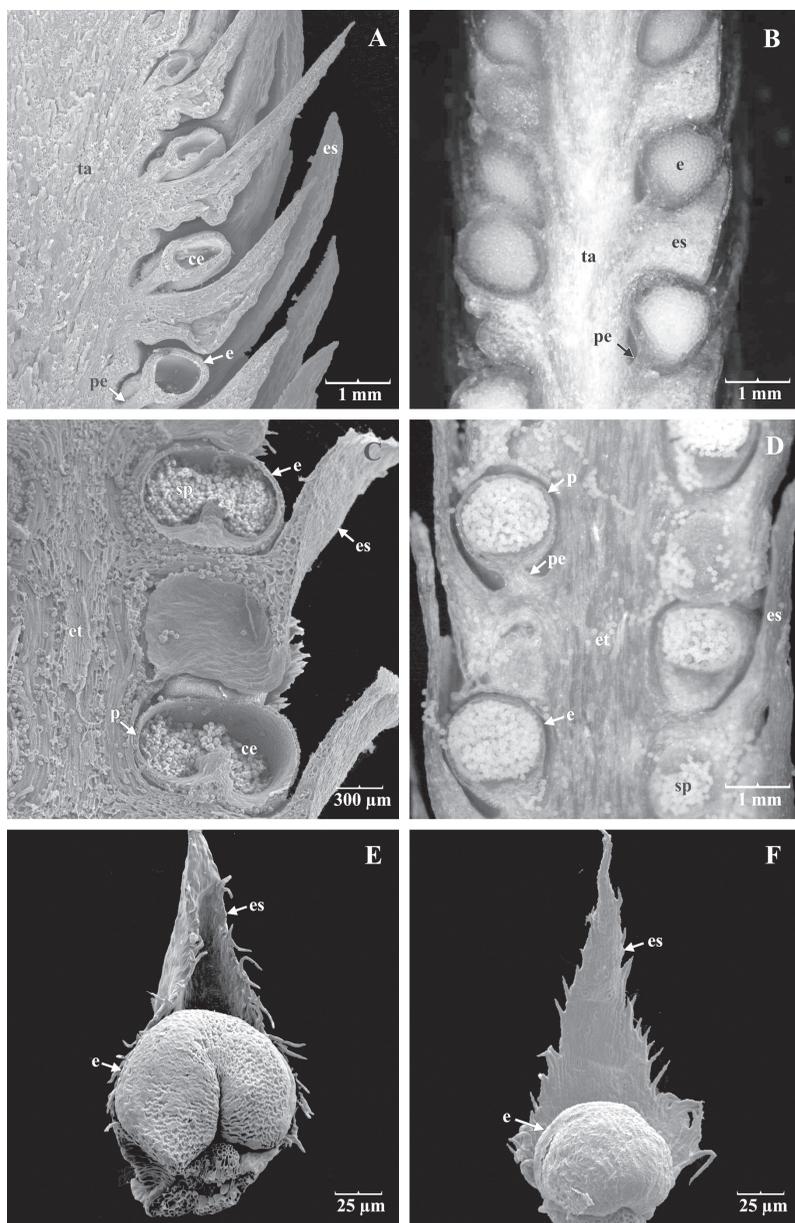


Fig. 1. Posición de los esporangios en relación con ejes y apéndices en Lycopodiaceae. **A.** *Huperzia crassa*, esporangios largamente pedicelados axilares. **B.** *Huperzia tetragona*, esporangios cortamente pedicelados axilares. **C.** *Lycopodium clavatum*, esporangios cortamente pedicelados adaxiales sobre esporofilos. **D.** *Diphasiastrum thyoides*, esporangios cortamente pedicelados axilares a esporofilos. **E.** *H. tetragona*, esporofilo sustentando un esporangio. **F.** *Palhinhaea cernua*, esporofilo sustentando un esporangio. ce: cavidad esporangial; e: esporangios; es: esporofilos; et: eje del estróbil; p: pared del esporangio; pe: pedicelo; sp: esporas; ta: tallo.

Fig. 1. Position of sporangia relative to axes and appendages in the Lycopodiaceae. **A.** *Huperzia crassa*, longly pedicellate, axilar sporangia. **B.** *Huperzia tetragona*, shortly pedicellate, axilar sporangia. **C.** *Lycopodium clavatum*, shortly pedicellate sporangia adaxial on the sporophylls. **D.** *Diphasiastrum thyoides*, shortly pedicellate sporangia, axilar to the sporophylls. **E.** *Huperzia tetragona*, sporophyll sustaining sporangium. **F.** *Palhinhaea cernua*, sporophyll sustaining sporangium. ce: sporangial cavity; e: sporangia; es: sporophylls; et: strobilar axis; p: sporangium wall; pe: pedicel; sp: spores; ta: stem.

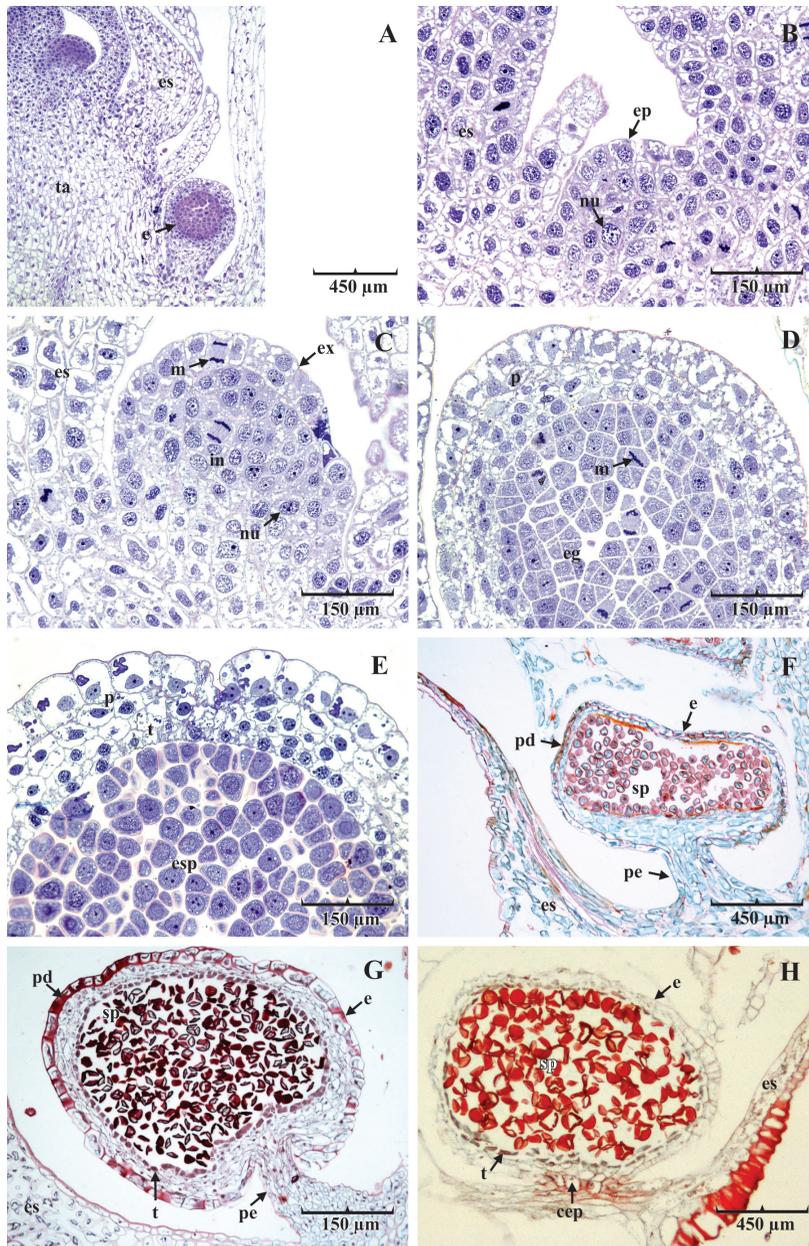


Fig. 2. Ontogenia de los esporangios de Lycopodiaceae. **A-E.** *Huperzia arcuata*, ontogenia de los esporangios hasta la etapa de formación de los esporocitos. **F-H.** Esporangios maduros. **F.** *Diphasiastrum thyoides*. **G.** *Huperzia phyllicifolia*. **H.** *Palhinhaea cernua*. cep: células del pedicelo lignificadas con engrosamientos escalariformes; e: esporangios; eg: tejido esporógeno; ep: células epidérmicas; es: esporofilos; esp: esporocitos inmaduros; ex: estrato celular externo; in: estrato celular interno; m: mitosis; nu: núcleos; p: pared del esporangio; pe: pedicelo; pd: células epidérmicas de la pared madura del esporangio; sp: esporas; t: tapete; ta: tallo.

Fig. 2. Ontogeny of sporangia of Lycopodiaceae. **A-E.** *Huperzia arcuata*, ontogeny of sporangia to the stage of formation of the sporocytes. **F-H.** Mature sporangia. **F.** *Diphasiastrum thyoides*. **G.** *Huperzia phyllicifolia*. **H.** *Palhinhaea cernua*. cep: pedicel lignified cells with scalariform thickenings; e: sporangia; ep: epidermal cells; eg: sporogenous tissue; es: sporophylls; esp: immature sporocytes; ex: external cell layer; in: internal cell layer; mi: mitosis; nu: nuclei; p: sporangium wall; pe: pedicel; pd: epidermal cells of the mature sporangium wall; sp: spores; t: tapetum; ta: stem.

Con el progreso de la diferenciación, el esporangio queda constituido por una pared de varios estratos celulares, incluido el tapete que se origina en el estrato más interno de esa pared y los esporocitos provenientes del tejido esporógeno (Fig. 2 E).

Con la maduración posterior se desarrolla por completo el pedicelo, se diferencia la pared madura del esporangio y los esporocitos experimentan meiosis formando tétradas de esporas que luego de su separación quedan libres en la cavidad esporangial (Fig. 2 F, G y H). En los pedicelos de *Lycopodiella* y *Palhinhaea* se observaron células de trasfusión cuyas paredes tienen engrosamientos escalariformes secundarios, agrupadas en cordones que se conectan con el tejido vascular de los esporofilos. Estas células no se observaron en los taxones de otros géneros (Fig. 2 H).

Desarrollo de la pared de los esporangios: En sus etapas iniciales, la pared del esporangio está constituida por un solo estrato de células aproximadamente cúbicas e isodiamétricas, con escaso citoplasma, numerosas vacuolas pequeñas, un núcleo grande eucromático en posición central y uno o dos nucléolos. Las paredes de estas células son primarias, celulósicas y dan una respuesta de color rosa claro a magenta ante la prueba con TBO (Fig. 3 A).

Las células se dividen inicialmente sólo por planos anticlinales. Las posteriores divisiones en planos periclinales aumentan el número de estratos celulares de la pared. En esta etapa se aprecia una creciente abundancia de vacuolas aunque el núcleo y las paredes celulares permanecen sin cambios estructurales (Fig. 3 B).

Las divisiones anticlinales y periclinales de las células de la pared del esporangio continúan hasta la formación de 3-4 estratos celulares que cubren por completo el tejido esporógeno. Las células de estos estratos tienen formas poligonales y contornos aproximadamente rectangulares, los núcleos se desplazan hacia posiciones excéntricas y numerosas vacuolas pequeñas presentes en el citoplasma, se fusionan para

formar una o dos vacuolas grandes que ocupa la mayor parte del citoplasma (Fig. 3 C y D). El estrato celular más externo, que formará la pared madura del esporangio está formado por células epidérmicas de paredes primarias poco engrosadas, especialmente las periclinales externas y en el citoplasma se encuentran abundantes plastidios con granos de almidón incluidos (Fig. 3 D).

Con la maduración del esporangio, el estrato celular externo, que formará la pared madura, desarrolla engrosamientos en todas sus paredes celulares. Las pruebas citoquímicas sobre la composición aún indican que las células tienen pared primaria compuesta por celulosa, polisacáridos carboxilados y ácidos pécticos y las respuestas ante el TBO son similares a las iniciales, pero se detecta un comienzo de cutinización cerca de la lámina media y en la superficie externa de las paredes periclinales, que reaccionan ante esas pruebas dando color azul púrpura (Fig. 3 E). En el citoplasma de estas células hay abundantes plastidios y una vacuola que ocupa la mayor parte del volumen celular. Los dos estratos celulares internos son similares al externo, pero carecen de engrosamientos en la pared primaria. El estrato celular más interno está formado por células con paredes primarias de contornos rectangulares con abundantes plastidios, numerosas vacuolas y un núcleo grande en posición central (Fig. 3 E). Este estrato celular se diferenciará para formar el tapete.

Coincidiendo con la maduración de las tétradas, las células epidérmicas que forman la pared externa del esporangio desarrolla engrosamientos secundarios, más marcados en la pared periclinal interna, compuestos por una mezcla de cutina con lignina y que dan reacción de color azul oscuro a azul-violáceo con TBO (Fig. 3 F), estos engrosamientos son menos desarrollados en *Lycopodiella* y *Palhinhaea*. Las células del estrato que se encuentra inmediatamente por debajo también suelen engrosarse de manera similar. Para este momento, las células del tapete se han desarrollado por completo, son algo globosas y tienen contornos subrectangulares, citoplasma con

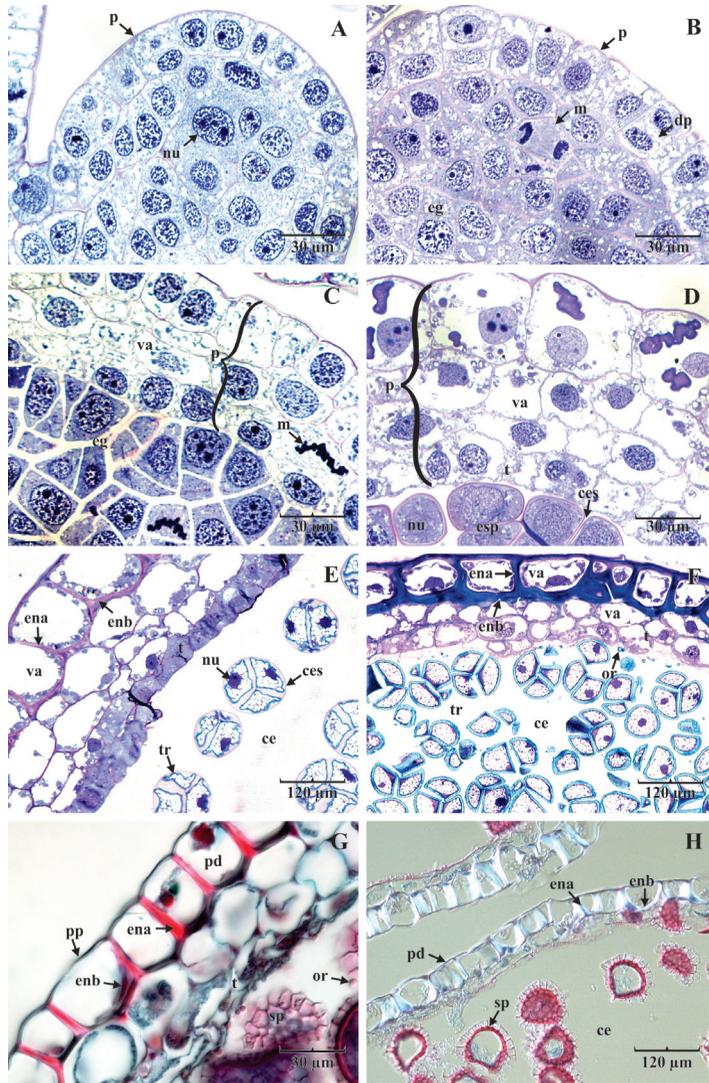


Fig. 3. Formación de la pared del esporangio en Lycopodiaceae. **A-F.** *Huperzia arcuata*. **A.** Pared indiferenciada del esporangio, con una capa celular. **B-D.** Desarrollo progresivo de la pared del esporangio. **E-F.** Etapas finales de la diferenciación de la pared y formación del tapete. **G-H.** *Lycopodium clavatum*. **G.** Colapso del tapete y capas celulares subyacentes, y liberación de esporas en la cavidad esporangial. **H.** Células epidérmicas de la pared madura del esporangio. ce: cavidad esporangial; ces: cubierta de los esporocitos; dp: división periclinal; eg: tejido esporógeno; ena: engrosamientos de las paredes anticlinales en células epidérmicas de la pared madura del esporangio; enb: engrosamientos de las paredes periclinales en células epidérmicas de la pared madura del esporangio; esp: esporocitos inmaduros; m: mitosis; nu: núcleos; or: orbículas; p: pared del esporangio; pd: células epidérmicas de la pared madura del esporangio; pp: pared periclinal; sp: esporas; t: tapete; tr: tétradas; va: vacuolas.

Fig. 3. Formation of wall sporangium in the Lycopodiaceae. **A-F.** *Huperzia arcuata*. **A.** Undifferentiated sporangium wall, with a single cell layer. **B-D.** Progressive differentiation of the sporangium wall. **E-F.** Final stages of differentiation of the sporangium wall and tapetum formation. **G-H.** *Lycopodium clavatum*. **G.** Collapse of the tapetum and layers below, and sending spores into the sporangial cavity. **H.** Epidermal cells of the mature sporangium wall. ce: sporangial cavity; ces: sporocyt coat; dp: periclinal division; eg: sporogenous tissue; ena: thickenings in anticlinal walls of epidermal cells of mature sporangium wall; enb: thickenings in periclinal walls of epidermal cells of mature sporangium wall; esp: immature sporocytes; m: mitosis; nu: nuclei; or: orbicules; p: sporangial wall; pd: epidermal cells of the mature sporangium wall; pp: periclinal wall; sp: spores; t: tapetum; tr: tetrads; va: vacuoles.

numerosos plástidios, vacuolas y un núcleo grande eucromático desplazado hacia la pared celular (Fig. 3 F). En la cavidad esporangial adyacentes al tapete se distinguen orbículas de esporopolenina evidenciadas por TBO.

Una vez que las esporas han madurado, el tapete y demás estratos celulares que forman la pared del esporangio experimentan apoptosis y colapsan rápidamente (Fig. 3 G). Finalmente, cuando las esporas son liberadas, sólo persisten las células epidérmicas de la pared madura del esporangio (Fig. 3 H).

Composición química y fluorescencia de las paredes de las cápsulas y pedicelos:

Las paredes anticlinales externas de las células epidérmicas de la pared madura del esporangio, en vista superficial, emiten fluorescencia en el rango de longitud de onda azul que se atribuye a la presencia de cutina casi pura (Fig. 4 A). Estas paredes no se tiñen con fluoroglucinol ácido, pero sí lo hacen las paredes periclinales internas y las anticlinales (Fig. 4 B y C), así como los engrosamientos escalariformes de las células de trasfusión de los pedicelos que sostienen los esporangios de *Lycopodiella* y *Palhinhaea*, indicando la presencia de lignina (Fig. 4 D). Las paredes periclinales externas también dan respuesta positiva con coloración anaranjada ante el Sudan III (Fig. 4 E). Los lípidos presentes en las paredes celulares de los esporangios confirman que se lleva a cabo una cutinización previa a la lignificación de la pared madura. Las paredes anticlinales y las periclinales internas, también dan respuesta positiva para lignina con TBO (Fig. 4 F). La lignina también es detectada con TBO en los engrosamientos escalariformes de las células de trasfusión de *Lycopodiella* y *Palhinhaea* dando la típica respuesta de color azul-verdoso (Fig. 4 G y H).

Desarrollo de las esporas y maduración del esporoderma: El tejido esporógeno a través de repetidas mitosis, origina los esporocitos que una vez formados empiezan a separarse en el interior de la cavidad esporangial. Los esporocitos inmaduros o recién diferenciados

del tejido esporógeno tienen pared primaria (la llamada cubierta de los esporocitos), son elipsoidales, con un núcleo grande central, varios nucléolos y un citoplasma con granulación fina y difusa (Fig. 5 A). Estas células madurarán para formar esporocitos premeióticos.

Los esporocitos premeióticos quedan por completo libres en la cavidad esporangial, son aproximadamente elipsoidales o esféricos, tienen núcleo grande en posición central, citoplasma de aspecto vacuolado, con abundantes granos de almidón y persiste la cubierta de los esporocitos que se tiñe de color magenta o rosa claro con TBO (Fig. 5 B).

Al inicio de la meiosis, durante la profase I, el núcleo de los esporocitos tiene posición parietal y aspecto fibrilar, debido a la formación del *bouquet* de cromosomas, mientras que en el citoplasma se aprecia una granulación fina y difusa. En esta etapa el tapete forma uno o, más raramente, dos estratos de células de contorno rectangular, núcleo grande eucromático en posición central y citoplasma de aspecto vacuolado (Fig. 5 C y D).

La meiosis de los esporocitos es simultánea. La primera división genera una célula 2-nucleada, sin pared entre los dos núcleos hijos. Al final de la profase I e inicio de la telofase I, la granulación citoplasmática se aprecia más hacia la periferia de la célula y al finalizar la división la granulación es homogénea en el citoplasma (Fig. 5 E).

Durante la meiosis II, en metafase, los cromosomas forman dos masas densamente empaquetadas que se disponen perpendiculares una con la otra, y el comportamiento de los gránulos citoplasmáticos es similar al descrito anteriormente (Fig. 5 F); luego de separarse forman un cenocito 4-nucleado en el que es posible distinguir los dominios citoplasmáticos de las futuras esporas (Fig. 5 G).

El exosporio se deposita al final de la meiosis II, quedando constituidas cuatro esporas que se disponen tetraédricamente y que permanecen juntas protegidas por la cubierta de los esporocitos (Fig. 5 H). El exosporio da una respuesta de color en la gama del azul claro intenso o casi turquesa ante el TBO, indicando

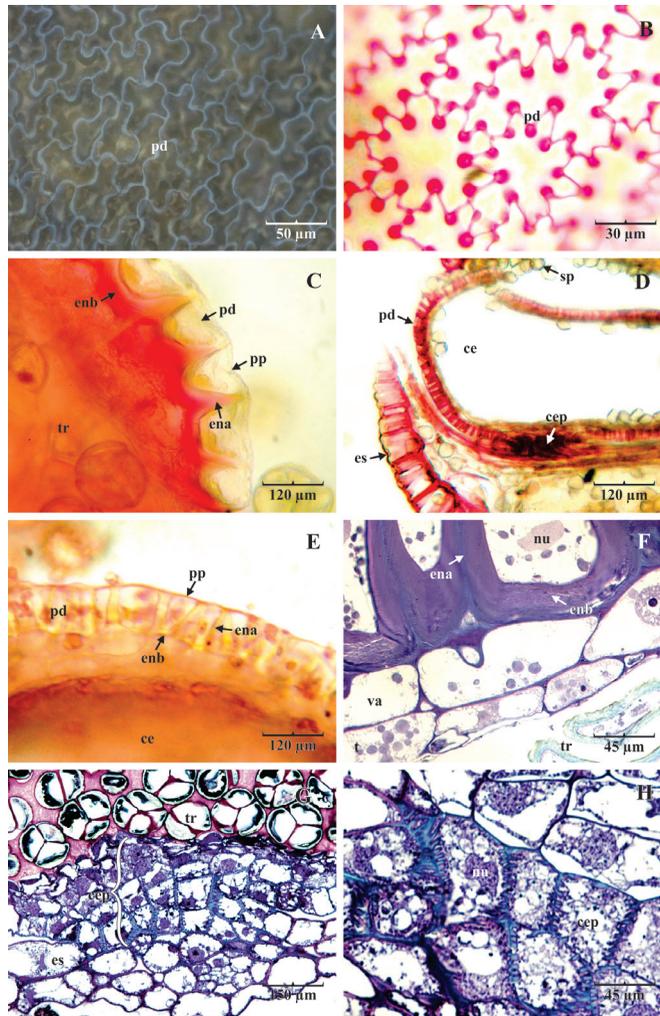


Fig. 4. Determinaciones de compuestos químicos formados durante la esporogénesis. **A.** Fluorescencia intrínseca de la cutina en células epidérmicas del esporangio de *Diphasiastrum thyoides* (material en fresco). **B-C.** Lignina en células epidérmicas del esporangio de *Diphasiastrum thyoides* y *Huperzia crassa* respectivamente, prueba del fluoroglucinol (material en fresco). **D.** Lignina en células epidérmicas y células de trasfusión de los pedicelos del esporangio y esporofilo de *Palhinhaea cernua*, corte longitudinal, prueba del fluoroglucinol (material en fresco). **E.** Lípidos en células de la pared del esporangio de *H. crassa*, corte transversal, prueba del Sudán III (material en fresco). **G-H.** Lignina en células de trasfusión en tejido del pedicelo de *Palhinhaea cernua*, prueba del fluoroglucinol. ce: cavidad esporangial; cep: engrosamientos escalariformes lignificados en células del pedicelo; ena: engrosamientos de las paredes anticlinales en células epidérmicas de la pared madura del esporangio; enb: engrosamientos de las paredes periclinales en células epidérmicas de la pared madura del esporangio; es: esporofilos; nu: núcleos; pd: células epidérmicas de la pared madura del esporangio; pp: pared periclinal; sp: esporas; t: tapete; tr: tétradas; va: vacuolas.

Fig. 4. Chemical compounds formed during sporogenesis. **A.** Cutin intrinsic fluorescence in epidermal cells of *Diphasiastrum thyoides* sporangium (fresh material). **B-C.** Lignin as phloroglucinol test in epidermal cells of *Diphasiastrum thyoides* and *Huperzia crassa* sporangium, respectively (fresh material). **D.** Lignin as phloroglucinol test in epidermal cells of sporangium, transfusion cells of the sporangium pedicels and sporophylls of *Palhinhaea cernua*, longitudinal section (fresh material). **E.** Lipids as Sudan III test in sporangium cell wall of *H. crassa*, transversal section (fresh material). **G-H.** Phloroglucinol test in transfusion cells of pedicel tissue in *Palhinhaea cernua*. ce: sporangium cavity; cep: scalariform thickenings in lignified cells of the pedicel; ena: thickenings in anticlinal walls of epidermal cells of mature sporangium wall; enb: thickenings in periclinal walls of epidermal cells of mature sporangium wall; es: sporophylls; nu: nuclei, pd: epidermal cells of the mature sporangium wall; pp: periclinal wall; sp: spores; t: tapetum; tr: tetrads; va: vacuoles.

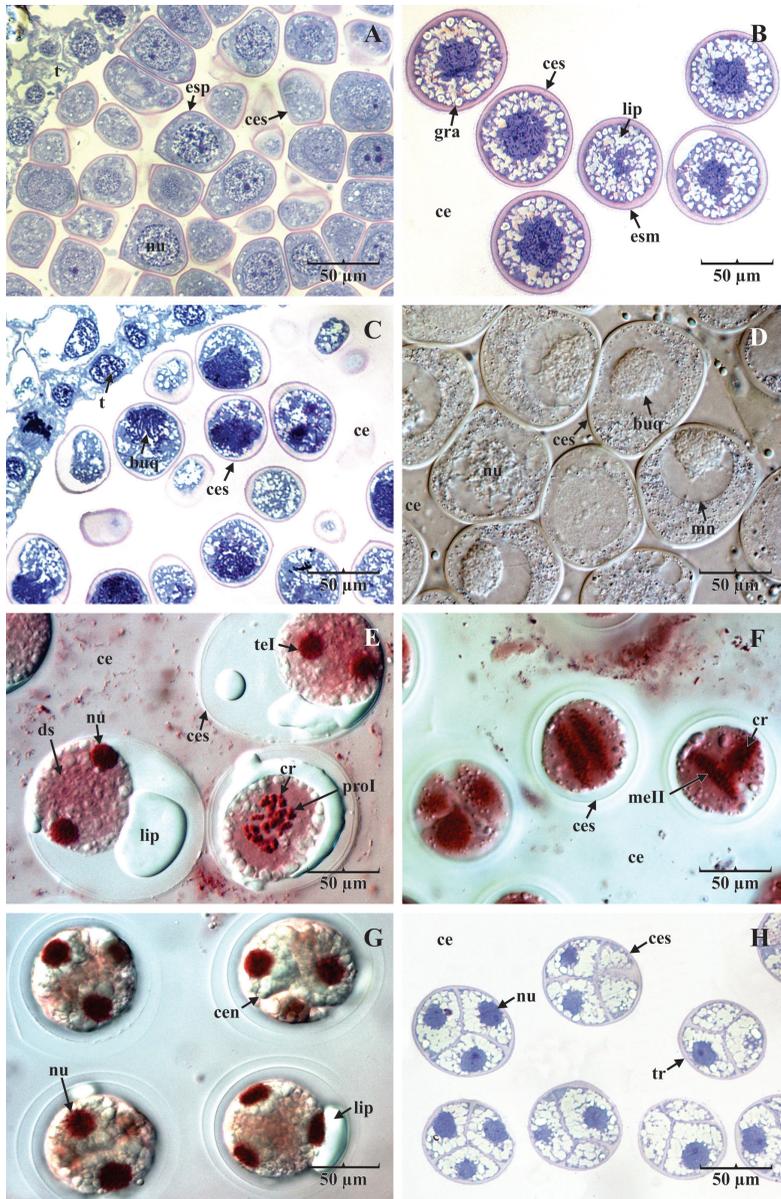


Fig. 5. Sporogénesis y formación del esporodermo de Lycopodiaceae. **A-B.** *Huperzia arcuata*, esporocitos inmaduros y premeióticos. **C-D.** *H. arcuata*, profase I, formación del bouquet de cromosomas. **E.** *Lycopodium clavatum*, meiosis I y II. **F.** *Palhinhaea cernua*, meiosis I y II. **G.** *Huperzia phylicifolia*, cenocito tetranucleado. **H.** *Huperzia rosenstockiana*, tétrada inmadura. buq: bouquet de cromosomas; ce: cavidad esporangial; ces: cubierta de los esporocitos; cr: cromosomas; ds: división simultánea; esm: esporocitos premeióticos; esp: esporocitos inmaduros; gra: granos de almidón; lip: vesículas lipídicas; meII: metafase II; mn: membrana nuclear; nu: núcleos; prol: final de la profase I; tel: telofase I; t: tapete; tr: tétradas.

Fig. 5. Sporogenesis and sporoderm formation in the Lycopodiaceae. **A-B.** *Huperzia arcuata*, immature and premeiotic sporocytes. **C-D.** *H. arcuata*, prophase I and chromosome bouquet. **E.** *Lycopodium clavatum*, meiosis I and II. **F.** *Palhinhaea cernua*, meiosis I and II. **G.** *Huperzia phylicifolia*, 4-nuclear coenocyte. **H.** *Huperzia rosenstockiana*, immature tetrads. buq: chromosome bouquet; ce: sporangial cavity; cen: 4-nuclear coenocyte; ces: sporocyte coat; cr: chromosomes; ds: simultaneous division; esm: premeiotic sporocytes; esp: immature sporocytes; gra: starch grains; lip: lipid vesicles; meII: metaphase II; mn: nuclear membrane; nu: nuclei; prol: end of prophase I; tel: telophase I; t: tapetum; tr: tetrads.

la presencia de esporopolenina (Fig. 6 A, B, C, D, E y F).

A medida que las esporas maduran, en la superficie interna del exosporio se deposita una capa fina de material fibroso que se colorea de color rosa intenso a rosa-púrpura con TBO. Esta capa es más engrosada en la zona de la abertura de la espora y corresponde al endosporio (Fig. 6 B, C, D, E y F). El exosporio se engrosa formando los patrones de ornamentación característicos.

En *Lycopodiella* y *Palhinhaea* se observó que en la superficie externa del exosporio se deposita un perisporio delgado de material granular fino que se tiñe de azul oscuro con TBO, el cual está ausente o no se deposita en otros taxones de Lycopodiaceae estudiados (Fig. 6 E).

Al término de la esporogénesis, las esporas maduras permanecen en el interior de los esporangios y en estos solo persisten las células epidérmicas de la pared madura (Fig. 6 G). Observadas con microscopio de fluorescencia con filtro ultravioleta, las paredes externas de las esporas maduras de Lycopodiaceae emiten autofluorescencia en la longitud de onda correspondiente al amarillo, coincidiendo con la autofluorescencia de la esporopolenina en esas condiciones (Fig. 6 H).

Almidón en el tejido esporógeno, esporocitos y esporas: El almidón se sintetiza desde etapas tempranas de la esporogénesis; en el citoplasma de las células del tejido esporógeno, forma pequeños granos esféricos, escasos y oscuros por efecto de la coloración con solución de Lugol (Fig. 7 A), los cuales aumentan en cantidad en los esporocitos inmaduros y premeióticos (Fig. 7 B y C). Al finalizar la meiosis, los granos de almidón se tornan escasos y rodean al núcleo de las esporas inmaduras en las tétradas recién formadas (Fig. 7 D). Conforme las esporas maduran, el almidón es consumido (Fig. 7 E y F).

Lípidos en el tejido esporógeno, esporocitos y esporas: Los lípidos se encuentran sobre la superficie de las células esporógenas

desde etapas tempranas del proceso de esporogénesis. Se aprecian como glóbulos que reaccionan dando color amarillento/anaranjado al reaccionar con el Sudán III (Fig. 8 A). A medida que los esporocitos maduran y se tornan premeióticos, los lípidos son más abundantes y forman una capa casi continua sobre la superficie interna de la cubierta de los esporocitos (Fig. 8 B y C). Hacia el final de la meiosis II, esta capa lipídica se introduce entre las esporas en desarrollo y disminuye progresivamente hasta desaparecer (Fig. 8 D).

Los lípidos están presentes en el citoplasma de las esporas inmaduras, formando grandes masas globulares (Fig. 8 E); a medida que estas maduran, las reservas de lípidos constituyen pequeños y abundantes glóbulos que ocupan la mayor parte del citoplasma y se rodean al núcleo (Fig. 8 F).

Mucopolisacáridos en el tejido esporógeno, esporocitos y esporas: Los mucopolisacáridos se acumulan entre las paredes de las células que forman el tejido esporógeno desde etapas tempranas de la ontogenia de los esporangios (Fig. 9 A). A medida que el tejido esporógeno se diferencia en esporocitos, los mucopolisacáridos son especialmente abundantes en la cavidad esporangial y disminuyen progresivamente con la maduración de las tétradas (Fig. 9 B y C). También la cubierta de los esporocitos presenta abundantes mucopolisacáridos durante todo el proceso de esporogénesis (Fig. 9 D, E y F).

Las células epidérmicas que formarán la pared definitiva del esporangio en etapas inmaduras presentan abundantes mucopolisacáridos en sus paredes celulares (Fig. 9 G). A medida que las paredes anticlinales y la periclinal interna maduran y se lignifican, los mucopolisacáridos gradualmente desaparecen (Fig. 9 H). Las pruebas químicas efectuadas y los compuestos determinados se resumen en el cuadro 2.

DISCUSIÓN

Según Rolleri (1972 a), Øllgaard (1987), Pita et al. (2006) y Arana & Øllgaard (2012),

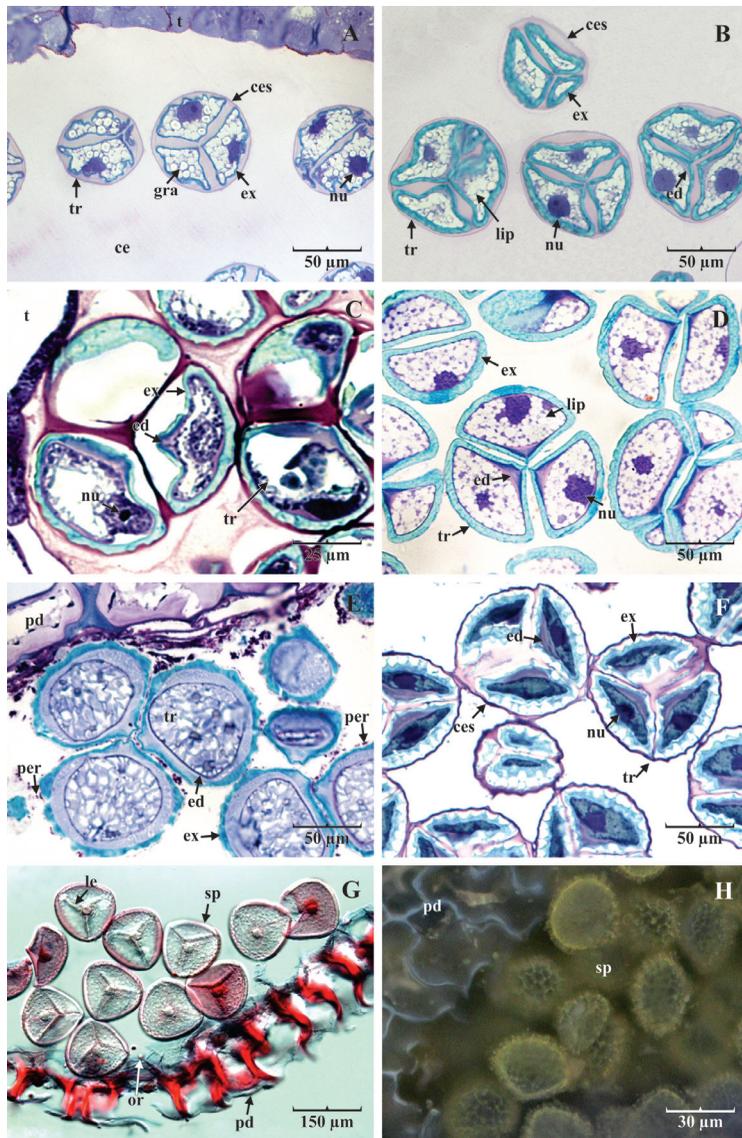


Fig. 6. Desarrollo del esporodermo de Lycopodiaceae. **A.** *Huperzia rosenstockiana*, tétradas inmaduras y esporas con exosporio. **B.** *Huperzia arcuata* y **C.** *Palhinhaea cernua*, tétradas con endosporio incipiente y exosporio desarrollado. **D.** *H. arcuata*, tétradas con endosporio y exosporio. **E.** *P. cernua*, tétradas con endosporio, exosporio y perisporio. **F.** *Diphasiastrum thyoides*, tétradas maduras, con endosporio y exosporio. **G.** *Huperzia phlycifolia*, esporas maduras. **H.** *Diphasiastrum thyoides*, fluorescencia intrínseca de la esporopolenina. ce: cavidad esporangial; ces: cubierta de los esporocitos; ed: endosporio; ex: exosporio; gra: granos de almidón; le: lesura; lip: depósitos lipídicos; nu: núcleos; or: orbículas; pd: células epidérmicas de la pared madura del esporangio; per: perisporio; sp: esporas; t: tapete; tr: tétradas.

Fig. 6. Sporoderm development in the Lycopodiaceae. **A.** *Huperzia rosenstockiana*, immature tetrads and spores with exospore of. **B.** *Huperzia arcuata*, developing tetrads, with exospore, and incipient endospore. **C.** *Palhinhaea cernua*, developing tetrads, with exospore and incipient endospore. **D.** *H. arcuata*, mature tetrads with already formed endospore and exospore. **E.** *P. cernua*, mature tetrads with already formed endospore and exospore. **F.** *Diphasiastrum thyoides*, mature tetrads with already formed endospore and exospore. **G.** *Huperzia phlycifolia*, mature spores. **H.** *Diphasiastrum thyoides*, intrinsic fluorescence of sporopollenin with ultraviolet light. ce: sporangial cavity; ces: sporocytes coat; ed: endospore; ex: exospore; gra: starch grains; le: lesura; lip: lipid deposits; nu: nuclei; or: orbicules; pd: epidermal cells of the mature sporangium wall; per: perisporio; sp: spores; t: tapetum; tr: tetrads.

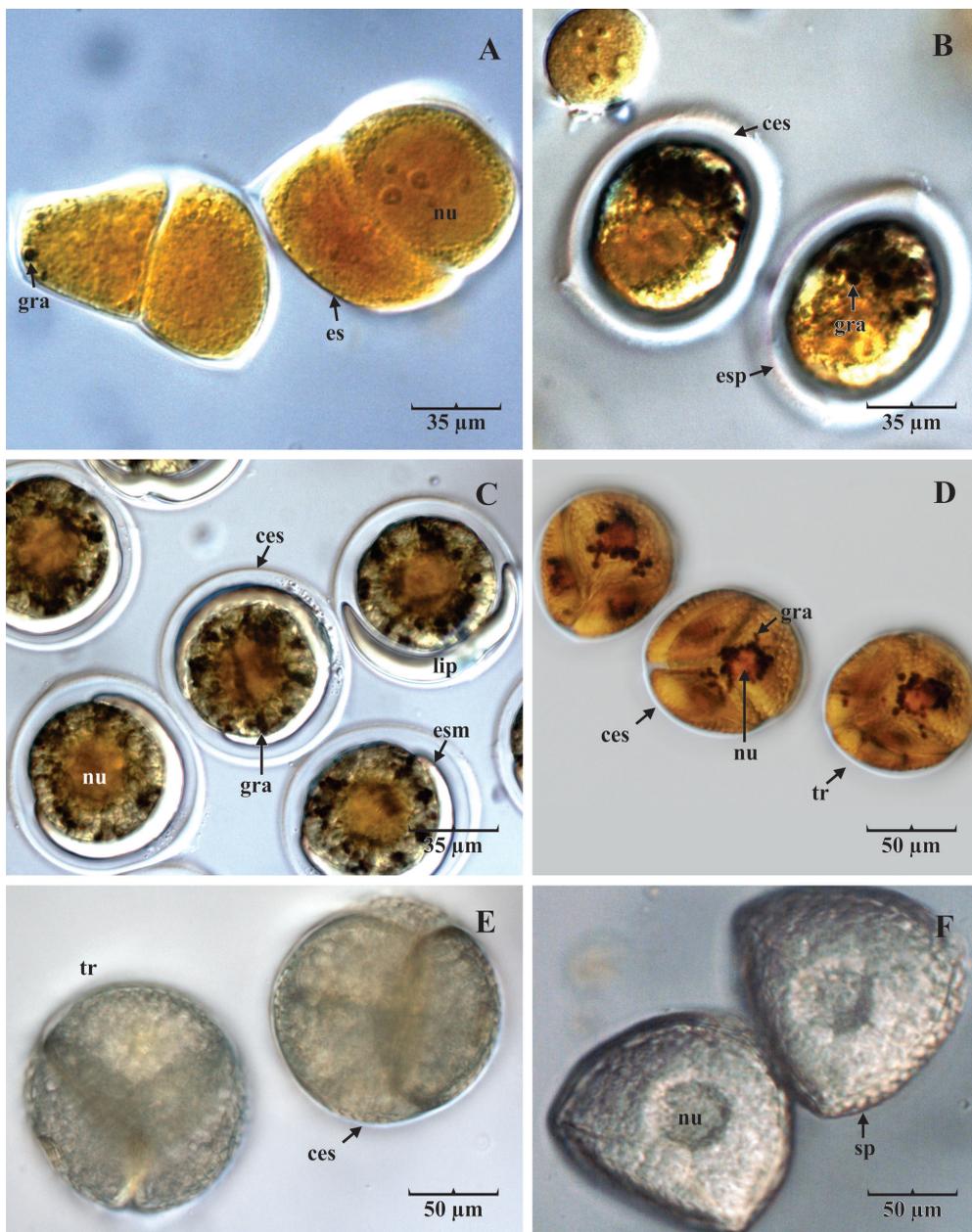


Fig. 7. Granos de almidón en tejido esporógeno, esporocitos y esporas de *Huperzia phyllicifolia* (material en fresco). **A.** Almidón escaso en el citoplasma del tejido esporógeno. **B-C.** Almidón en esporocitos inmaduros y premeióticos. **D.** Almidón en esporas inmaduras. **E-F.** Tétradas de esporas maduras sin almidón. ces: cubierta de los esporocitos; es: células del tejido esporógeno; esm: esporocitos premeióticos; esp: esporocitos inmaduros; gra: granos de almidón; lip: depósitos lipídicos; nu: núcleos; sp: esporas; tr: tétradas.

Fig. 7. Starch grains in sporogenous tissue, sporocytes and spores of *Huperzia phyllicifolia* (fresh material). **A.** Scarce starch of sporogenous tissue cytoplasm. **B-C.** Starch into immature and premeiotic sporocytes. **D.** Starch grains in immature spores. **E-F.** Tetrads of immature spores without starch grains. ces: sporocytes coat; es: cells of sporogenous tissue; esm: premeiotic sporocytes; esp: immature sporocytes; gra: starch grains; lip: lipid deposits; nu: nuclei; sp: spores; tr: tetrads.

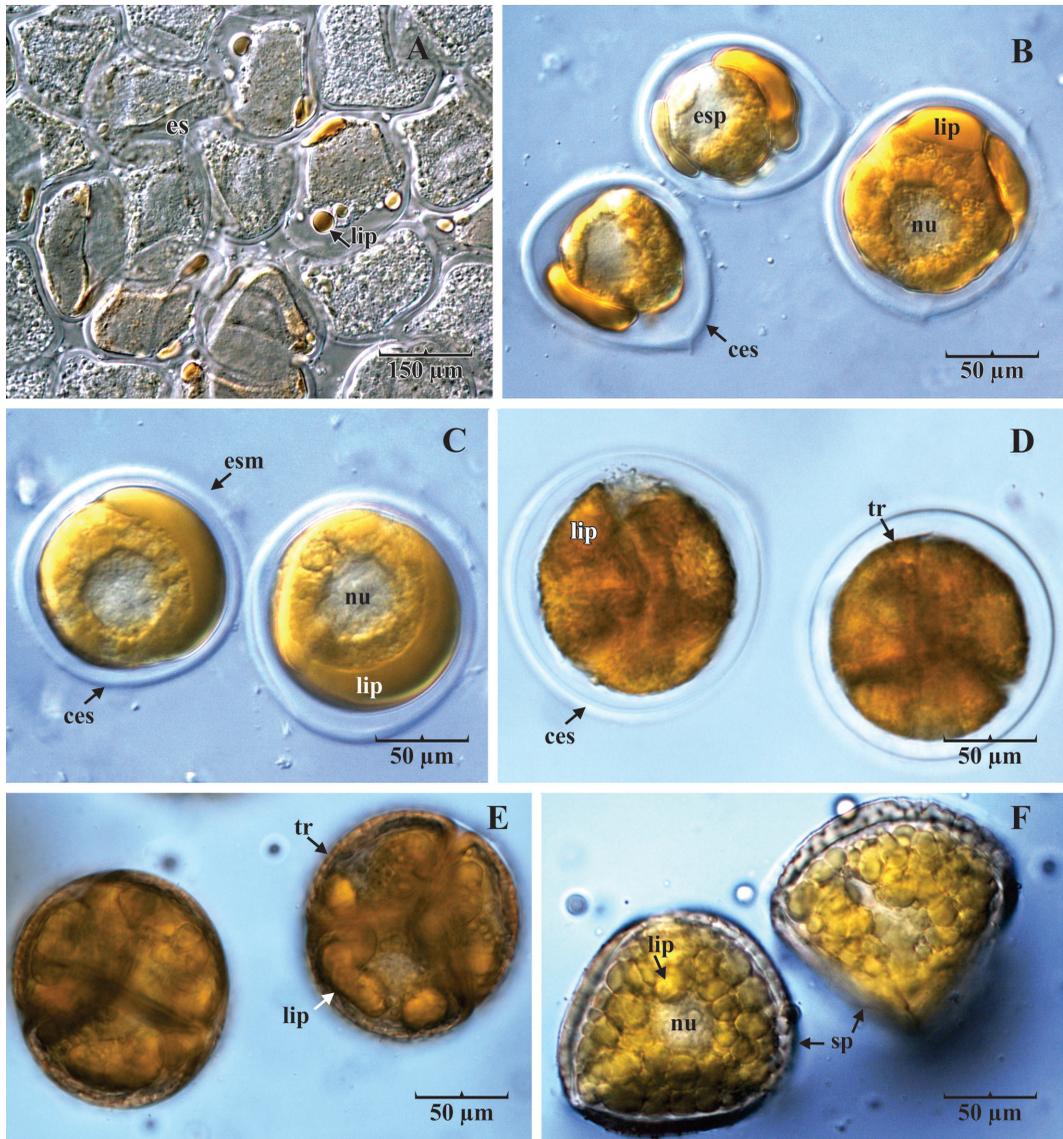


Fig. 8. Lípidos en el tejido esporígeno, esporocitos y esporas de *Huperzia phyllicifolia* (material en fresco). **A.** Lípidos en la periferia del citoplasma de las células esporógenas. **B-C.** Capa uniforme y continua de lípidos entre los esporocitos y su cubierta. **D.** Lípidos en el citoplasma de esporas inmaduras. **E.** Lípidos en el citoplasma de esporas maduras. **F.** Lípidos abundantes en el citoplasma de esporas maduras. ces: cubierta de los esporocitos; es: células del tejido esporígeno; esm: esporocitos premeióticos; esp: esporocitos inmaduros; lip: depósitos lipídicos; nu: núcleos; sp: esporas; tr: tétradas.

Fig. 8. Lipids in sporogenous tissue, sporocytal coats and spores of *Huperzia phyllicifolia* (fresh material). **A.** Lipids in the periphery of sporogenous cells cytoplasm. **B-C.** Uniform, continuous layer of lipids between the sporocytal coats and sporocytal coats. **D.** Lipids in cytoplasm of immature spores. **E.** Lipids in cytoplasm of mature spores. ces: sporocytal coats; es: cells of sporogenous tissue; esm: premeiotic sporocytal coats; esp: immature sporocytal coats; lip: lipid deposits; nu: nuclei; sp: spores; tr: tetrads.

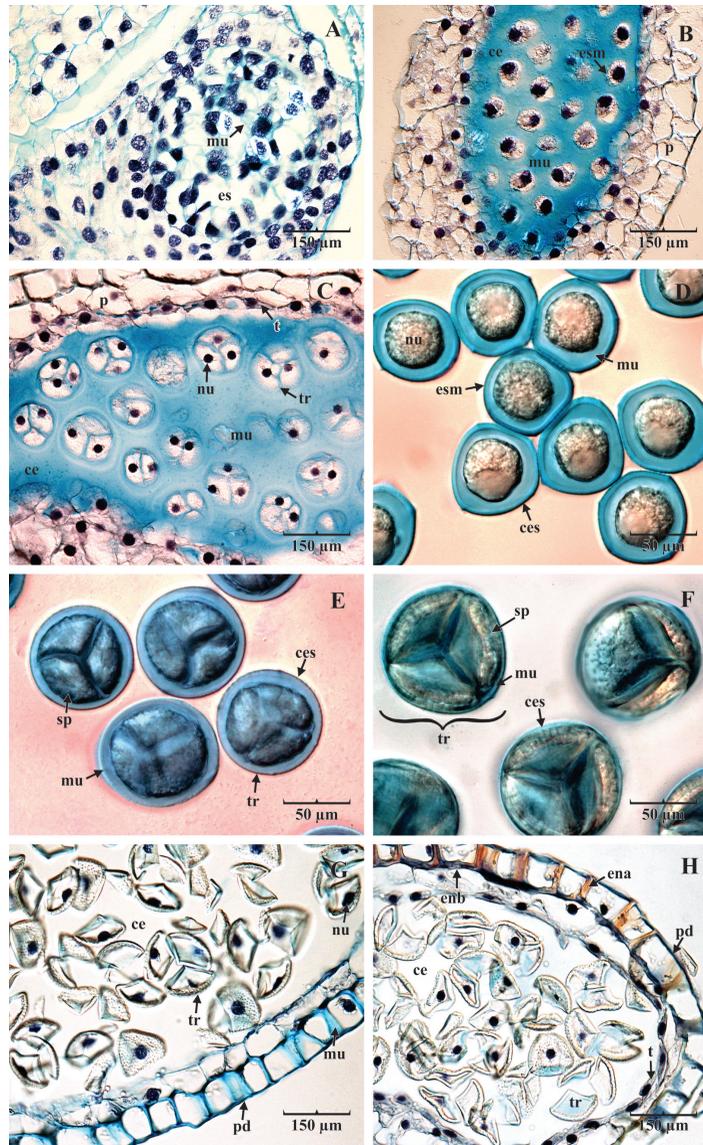


Fig. 9. Mucopolisacáridos en el tejido esporógeno, esporocitos y esporas de *Huperzia phyllicifolia*. **A.** Mucopolisacáridos entre las células del tejido esporógeno. **B-C.** Mucopolisacáridos concentrados en la cavidad esporangial. **D-F.** Mucopolisacáridos concentrados en la cubierta de los esporocitos (material en fresco). **G.** Esporangios en desarrollo sin mucopolisacáridos en la cavidad esporangial. **H.** Pared madura engrosada del esporangio. ce: cavidad esporangial; ces: cubierta de los esporocitos; ena: engrosamientos de las paredes anticlinales en células epidérmicas de la pared madura del esporangio; enb: engrosamientos de las paredes periclinales en células epidérmicas de la pared madura del esporangio; es: células del tejido esporógeno; esm: esporocitos premeióticos; mu: mucopolisacáridos; nu: núcleos; p: pared del esporangio; pd: células epidérmicas de la pared madura del esporangio; sp: esporas; t: tapete; tr: tétradas.

Fig. 9. Mucopolysaccharides in sporogenous tissue, sporocysts and spores of *Huperzia phyllicifolia*. **A.** Mucopolysaccharides between sporogenous tissue cells. **B-C.** Concentration of mucopolysaccharides into the sporangial cavity. **D-F.** Concentration of mucopolysaccharides in the sporocyst coat (fresh material). **G.** Mature sporangia without mucopolysaccharides into the sporangial cavity. **H.** Adult wall of mature sporangium. ce: sporangial cavity; ces: sporocyst coat; ena: thickenings in anticlinal walls of epidermal cells of mature sporangium wall; enb: thickenings in periclinal walls of epidermal cells of mature sporangium wall; es: cells of sporogenous tissue; esm: premeiotic sporocysts; muc: mucopolysaccharides; nu: nuclei; p: sporangium wall; pd: epidermal cells of the mature sporangium wall; sp: spores; t: tapetum; tr: tetrads.

CUADRO 2

Pruebas realizadas y resultados obtenidos presentados en orden alfabético

TABLE 2

Tests performed and obtained results presented in alphabetical order

| Compuesto | Reactivo | Reacción de color | Proceso, etapa o sitio en el que se probó el compuesto (+, presencia; - ausencia) |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---|
| Almidón | Solución de Lugol | Azul-negro | Citoplasma de células del tejido esporógeno (+), citoplasma de esporocitos y esporas inmaduras (+), esporas maduras (-), esporoderma (-) |
| Cutina | TBO | Azul oscuro a púrpura | Células epidérmicas de la pared madura de los esporangios (+) |
| Esporopolenina | TBO | Azul verdoso claro (turquesa) | Exosporio (+) |
| Lignina | Fluoroglucinol TBO | Rojo Azul verdoso | Células epidérmicas de la pared madura de los esporangios y células de transfusión en pedicelos de <i>Lycopodiella</i> (+), esporoderma (-) |
| Lípidos y cutina | Sudán III | Amarillo-anaranjado | Células esporógenas (+), citoplasma de esporocitos y esporas (+), superficie de los esporocitos (+), esporoderma (-), células epidérmicas de la pared madura de los esporangios (+) |
| Mucopolisacáridos ácidos | Azul alcian | Azul claro | Células esporógenas (+), cubierta de los esporocitos (+), cavidad esporangial con tétradas inmaduras (+) y con tétradas maduras (-). Células epidérmicas de la pared inmadura de los esporangios (+) y Células epidérmicas de la pared madura de los esporangios (-), esporoderma (-) |
| Paredes primarias celulósicas | TBO | Rosa a magenta | Cubierta de los esporocitos, paredes primarias y endosporio (+) |

los esporofilos de Lycopodiaceae pueden estar agrupados o no en estróbilos y los esporangios son solitarios, reniformes a subglobosos, uniloculares, dehiscentes por un área transversal que los divide en dos valvas, y se encuentran ubicados sobre la cara adaxial o en la base de los esporofilos y maduran de forma basípeta. También se ha señalado que los esporangios se originan sobre la cara adaxial de los esporofilos jóvenes, cerca de su inserción en el eje caulinar, y que ontogénicamente derivan de un grupo reducido de células epidérmicas que por divisiones anticlinales y periclinales sucesivas conlleva a la formación del primordio del esporangio que continúan dividiéndose y diferenciándose hasta la formación del esporangio

maduro (Sykes, 1908; Rolleri, 1972 a, b; Bruce 1976 a; Sersic, 1983; Øllgaard, 1987; Uehara & Kurita, 1991; Gola, 2008; Rincón et al., 2009). Todos los rasgos descritos anteriormente coinciden con los hallazgos de esta investigación, y se comprueba que no existen variaciones apreciables, y por lo tanto se los considera caracteres de familia.

La pared del esporangio en Lycopodiaceae está formada por el estrato interno que formará el tapete, los estratos intermedios que degeneran con la madurez y el estrato celular externo. Este último es de especial interés ya que presenta engrosamientos en forma de “U” (Rolleri, 1972 a; Øllgaard, 1975; Sersic, 1983; Rincón et al., 2009). Aquí se observó que estos

engrosamientos se desarrollan a medida que las paredes anticlinales y la periclinal interna se lignifican, un proceso de diferenciación que confiere a la pared del esporangio la resistencia suficiente para contener el número creciente de esporas que sólo se liberarán en la madurez. Øllgaard (1987) señala que los engrosamientos de lignina están muy desarrollados en el estrato más externo de la pared del esporangio de *Huperzia* y *Lycopodium*, en tanto que son débiles o están ausentes en *Lycopodiella* (*s. l.*). Las observaciones de esta investigación indican que independientemente de su grado de desarrollo, los engrosamientos de lignina están siempre presentes en las células epidérmicas que forman la pared madura de los esporangios de todos los taxones analizados. Se ha señalado que en helechos leptosporangiados y algunos licófitos heterosporados, estos engrosamientos diferenciales de lignina facilitan la liberación de las esporas actuando a manera de “catapulta”, dispersándolas a cierta distancia de la planta madre (Moran, 2004; Noblin et al., 2012; Webster, 1995; Schneller, Gerber & Zuppiger, 2008). En Lycopodiaceae la liberación de las esporas ocurre por la separación de las dos valvas que forman el esporangio y podría estar relacionado con algún tipo de mecanismo fisiológico de colapso celular controlado.

El tapete es una estructura presente en todas las plantas, aporta sustancias de reserva y otras, contribuyendo a la síntesis de precursores de la pared de las esporas y granos de polen. Uehara & Kurita (1991) y Rincón et al. (2009) sugieren que el tapete de *L. clavatum* y *H. brevifolia* contribuye a la formación de la pared de las esporas utilizando como vehículo de transporte el fluido presente en la cavidad esporangial. La presencia de orbículas en la cavidad del esporangio en las especies estudiadas podría dar apoyo a esta idea. En observaciones realizadas con microscopía electrónica de transmisión en *D. thyooides* se ha podido observar la secreción activa de orbículas a través del fluido de la cavidad esporangial en dirección de las tétradas en desarrollo, lo que confirmaría esa función secretora del tapete (Rincón et al. com. pers.)

Sykes (1908) describió la presencia de células de paredes lignificadas en los pedicelos de los esporangios de *Lycopodiella s.l.* y sugirió su función de transfusión por proximidad con el haz vascular de los esporofilos. Gensel (1992) asignó también esa función al tejido vascular de los pedicelos esporangiales del género fósil *Asteroxylon* Kidst. & W.H. Lang. Las células similares halladas en especies de *Lycopodiella* y *Palhinhaea* tendrían la misma función. Análisis recientes de los estróbilos de *P. cernua* con MEB y MET confirman la conexión directa entre estas células de transfusión y el haz vascular de los esporofilos, así como, su naturaleza parenquimática y que permanecen vivas hasta la liberación de las esporas (Rincón et al. en prep.).

La diferenciación y proliferación celulares que conducen a la formación de esporocitos premeióticos a partir de las células del tejido esporógeno han sido escasamente analizadas en Lycopodiaceae (Rolleri, 1972 a; Sersic, 1983; Rincón et al., 2009), por lo que los aportes de esta investigación constituyen un avance en el conocimiento de esos mecanismos en estos taxones. Los esporocitos presentan una capa o cubierta superficial (sporocyte coat, según Pettitt & Jermy, 1974) que se forma sobre las células madres de las esporas en los pteridófitos en general. Esta cubierta también fue descrita por Sersic (1983), Uehara & Kurita (1991) y Rincón et al. (2009) en Lycopodiaceae. Estos últimos autores señalaron que en *H. brevifolia* la cubierta de los esporocitos se pierde en algún momento de la meiosis I y se vuelve a formar durante la meiosis II. Sin embargo, la evidencia surgida de esta nueva investigación indica que la cubierta de los esporocitos no se pierde en el curso de la meiosis y que la situación descrita previamente por estos autores podría explicarse por acción del fijador utilizado (FAA) en la preparación de las muestras. Resultados similares se observaron al fijar con este mismo compuesto los esporangios de Lycopodiaceae, en tanto que el material fijado con glutaraldehído conservó intacta la cubierta de los esporocitos. La respuesta con TBO indica que la composición química corresponde a pared primaria tal como

lo sugiere Sersic (1983) para *H. saururus* y Uehara & Kurita (1991) en *L. clavatum*.

La meiosis experimentada por los esporocitos en Lycopodiaceae es simultánea y termina con la formación de una célula tetranucleada que posteriormente se separa en cuatro células que forman la tétrada de esporas. Este comportamiento es similar a lo observado en otras especies de Lycopodiaceae (Sersic, 1983; Rincón et al., 2009), en briofitos y pteridofitos (Furness, Rudall & Sampson, 2002). Estos autores establecen que la división simultánea está relacionada con los grupos de plantas que producen esporas triletes en posición tetraédrica y por ende, con el arreglo perpendicular de los paquetes de cromosomas que se observó durante la metafase II de las especies de Lycopodiaceae analizadas. Aunque en algunos musgos y hepáticas que presentan división sucesiva, con paredes celulares separando los dos núcleos hijos después de la meiosis I, se forman tétradas de esporas en posición tetraédrica (Furness et al., 2002). Por lo general, la división sucesiva se relaciona con la formación de tétradas de esporas en posición tetragonal, lineal, decusada y en forma de "T". La división simultánea se considera un carácter ancestral y la sucesiva un carácter derivado que ha surgido de manera independiente a lo largo del proceso evolutivo, y los dos tipos de división se presentan en la microsporogénesis de todos los grupos de plantas (Furness et al., 2002; Blackmore, Wortley, Skvarla & Rowley, 2007; Simpson, 2010).

Durante la profase I se observó el desarrollo del *bouquet* de cromosomas, una condición común a todos los grupos de organismos vivos, incluidos plantas, animales y hongos (Harper, Golubovskaya & Cande, 2004; Ronceret & Pawlowski, 2010). Este arreglo temporal de los cromosomas tiene lugar sólo en la meiosis y consiste en la unión de todos los cromosomas en un punto de la membrana nuclear a través de los telómeros. La función del *bouquet* de cromosomas se ha relacionado con el apareamiento correcto de los mismos (Ronceret, Sheehan, & Pawlowski, 2008) y con su desplazamiento rápido durante el zigóteno (Ronceret

& Pawlowski, 2010). Dado que en Lycopodiaceae la formación del *bouquet* de cromosomas coincide con otros organismos tanto en las características como en el momento del proceso en el cual se produce, la función podría ser también la misma.

Actualmente, son escasos los trabajos que describen el desarrollo y depósito de las capas que constituyen el esporoderma de las esporas de Lycopodiaceae (Lugardon, 1990; Tryon & Lugardon, 1991; Uehara & Kurita, 1991; Wellman et al., 2009). Estos autores concuerdan en que primero se deposita el exosporio, luego el endosporio y por último el perisporio, si este se desarrolla. Así mismo, también señalan que la esporopolenina es el principal componente del exosporio mientras que el endosporio está constituido por material fibrilar de naturaleza celulósica sin impregnaciones de esporopolenina. Según Southworth (1973) el TBO reacciona de forma diferencial con la esporopolenina y otros compuestos presentes en el esporoderma y permite determinarlos y distinguirlos. Aquí se han confirmado todas esas observaciones. La autofluorescencia amarilla intrínseca del exosporio maduro de Lycopodiaceae confirmó también la presencia de esporopolenina. La reacción observada en las paredes de las células vegetativas, las células del tapete y el endosporio ante el TBO indican que se trata de materiales de pared primaria.

La estructura del esporoderma maduro de las especies de Lycopodiaceae es similar a la descrita para *L. clavatum* por Uehara & Kurita (1991), excepto por la presencia del perisporio en las especies de *Lycopodiella* y *Palhinhaea*, algo que remite al llamado paraexosporio en el fósil homosporado *Leclercquia complexa* Banks, aunque su origen y composición serían diferentes (Lugardon, 1990; Wellman et al., 2009). Tryon & Tryon (1982) sugieren la presencia de perisporio en las esporas de *L. clavatum* del Neotrópico, en tanto que las observaciones de Uehara & Kurita (1991) a partir de material del Japón indican lo opuesto. En este trabajo y otras observaciones (Rincón et al. en prep.) las esporas de *L. clavatum* en

ejemplares procedentes de Colombia carecen de perisporio.

Las esporas de *Huperzia* son foveoladas o fosuladas, mientras que las de *Lycopodiella* y *Palhinhaea* ruguladas o rugadas y las de *Lycopodium*, *Diphasiastrum* y *Diphasium* tiene ornamentación reticulada. Estos patrones de ornamentación observados concuerdan con las descripciones previas hechas por Wilce (1972), Øllgaard (1987), Tryon & Lugardon (1991), y Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005). Sin embargo, los tipos de ornamentación observados en la familia (Lellinger & Taylor, 1997) no coinciden con la marcada fragmentación genérica propuesta más recientemente (Øllgaard, 20012 a, b), pero sí podrían ser asumidas como caracteres de subfamilia, con algunas variaciones en los tipos agrupados en cada clase, algo que está en estudio para un trabajo próximo (Rincón et al. en prep.).

En Lycopodiaceae el almidón se acumula inicialmente en el citoplasma de las células del tejido esporógeno, y luego en los esporocitos y tétradas de esporas inmaduras. El aumento en la concentración de almidón en etapas iniciales de la esporogénesis, sugiere su utilización como fuente de energía a corto plazo y en etapas de gran actividad metabólica, algo que no es sólo propio de los licopodios (Rolleri, 1972 a; Ibars, Vilar, Iranzo & Salvo, 1988) sino de la mayoría de las plantas (Taiz & Zeiger, 2010). Sersic (1983) señala que el almidón también podría ser utilizado como precursor de materiales para la formación del esporoderma en *H. saururus*, hipótesis que no se contradice con lo observado en las especies en la presente investigación y para las Lycopodiaceae en general.

En los helechos se ha determinado que los triacilgliceroles pueden llegar a constituir entre el 25-79% del peso seco de las esporas (Gullvag, 1969; Gemmrich, 1977; Randi & Felipe, 1988; Raghavan, 1989; Ballesteros & Walters, 2007; Ballesteros 2011; Gabriel, Galán & Prada, 2011). Sersic (1983), Lugardon (1990), Uehara & Kurita (1991) y Rincón et al. (2009), observaron abundantes reservas lipídicas en el citoplasma de los esporocitos y las esporas de algunas especies de Lycopodiaceae.

Estos hallazgos coinciden con los resultados de esta investigación, y sugieren la importancia de los lípidos como sustancias de reserva energética de las esporas maduras en esta familia. Es posible que los lípidos observados en la superficie interna de la cubierta de los esporocitos se utilicen también en la formación de la esporopolenina del esporoderma (Domínguez, Mercado, Quesada & Heredia, 1999; Piffanelli, Ross & Murphy, 1998, Eliseu & Dinis, 2008; Cronk, 2009; Ariizumi & Toriyama, 2011; Wallace, Fleming, Wellman & Beerling, 2011). Las abundantes reservas de lípidos en las esporas de Lycopodiaceae podrían también relacionarse con los largos períodos de latencia de las esporas no clorofilicas, que permanecen en el sustrato por periodos prolongados hasta entrar en contacto con los hongos micorrícicos necesarios para la germinación y desarrollo del gametófito no fotosintético (Raghavan, 1989; Whittier, 1998).

A la fecha no hemos encontrado trabajos que determinen con exactitud la composición del fluido presente en la cavidad esporangial de los pteridófitos, y es desconocida la complejidad y la función de los mucopolisacáridos cuya presencia se determina durante el proceso de esporogénesis en las Lycopodiaceae. Estos mucopolisacáridos también fueron localizados en los canales mucilaginosos de los esporofilos y trofofilos de *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Palhinhaea*.

Bruce (1976 b) indica que los mucopolisacáridos presentes en los canales de mucilago podrían relacionarse con la protección del esporofito contra la desecación y con la acumulación de metabolitos, como una forma de evitar el ataque de herbívoros o, incluso, con el fin de ayudar a la liberación de las esporas al causar la reflexión de los esporofilos. Estas propuestas no carecen de probabilidad si se consideran el amplio rango altitudinal de estas especies y las características morfológicas y anatómicas poco eficientes en evitar la transpiración (Rolleri, 1975; Bruce, 1976 b). Teniendo en cuenta lo anterior, y dado que los mucopolisacáridos son especialmente abundantes en la cavidad esporangial durante las etapas

tempranas de la esporogénesis, estos compuestos podrían evitar la desecación de aquellas células más susceptibles a deshidratarse durante las etapas tempranas de la formación de las esporas. La capacidad de los mucopolisacáridos como reguladores del contenido hídrico ha sido verificada en varios grupos de plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico (Bruce, 1976b; Majdoub, Picton, Cerf & Roudesli, 2010; Ghanem et al., 2010). En la cavidad de los lóculos de las anteras de angiospermas se acumulan varios tipos de polisacáridos solubles y proteínas, originados en el tapete y necesarios para la hidratación y desarrollo de los granos de polen (Clément, Laporte & Audran, 1998; Castro & Clément, 2007; Pacini, 2010), de modo que es posible que los mucopolisacáridos presentes en la cavidad esporangial de Lycopodiaceae funcionen igualmente como compuestos de pasaje entre el tapete y las células en desarrollo, incluso, aportando constituyentes indispensables para el desarrollo de las esporas y de su pared. También es posible que los mucopolisacáridos tengan alguna intervención en la apertura de las dos valvas que forman la pared madura de los esporangios, ya que desaparecen por completo una vez éstos han madurado, podrían, por ausencia, conducir a una desecación del área de abertura y facilitar la separación de las valvas, tal como observó Pacini (2010) durante la dehiscencia de las anteras.

Finalmente, además de los aportes realizados sobre aspectos anatómicos y funcionales, la conclusión amplia de este trabajo permite establecer que hay pocas variaciones apreciables en la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de Lycopodiaceae. Los eventos descritos no son estrictamente específicos o genéricos, sino rasgos de familia que apuntan a la uniformidad de estos taxones en relación con su biología reproductiva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las siguientes instituciones y personas: Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia (UdeA- laboratorio

de Botánica), Departamento de Biología Universidad del Valle (UNIVALLE-Sección Botánica), Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca (UNICAUCA), Laboratorio de Microscopía Eléctrica de Barrido de la Escuela de Materiales (UNIVALLE), a Silvia Espinosa Matías de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por su aporte con algunas imágenes en MEB y a Sayonara Plata (UdeA) por su colaboración en la edición fotográfica. Este estudio forma parte de una serie de trabajos que integrará la Tesis Doctoral del primer autor, quien agradece también a Benjamin Øllgaard (Universidad de Aarhus, Dinamarca) por su valiosa ayuda en la identificación de algunos especímenes y suministro de material bibliográfico y a Ricardo Callejas (Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia, UdeA) por sus acertados comentarios y sugerencias al manuscrito final.

RESUMEN

Los estudios sobre aspectos reproductivos no son muy abundantes en la literatura científica sobre los taxones de Lycopodiaceae y constituyen información esencial para apoyar la taxonomía y relaciones sistemáticas en el grupo. Por lo tanto, se presenta aquí un análisis detallado de la ontogenia de los esporangios y esporogénesis, así como determinaciones químicas de varios compuestos generados durante la formación de las esporas. Los análisis se llevaron a cabo en 14 taxones de seis géneros de la familia: *Diphasiastrum*, *Diphasium*, *Huperzia* (un género que se trata aquí, incluyendo *Phlegmariurus*), *Lycopodiella*, *Lycopodium* y *Palhinhaea*. Las muestras fueron recolectadas en tres departamentos de los Andes de Colombia entre 1 454-3 677m de altitud. La ontogenia se estudió en trozos de estróbilos y ejes, de 1cm de largo, que se fijaron en glutaraldehído o FAA, se deshidrataron en alcohol, se incluyeron en LR White, se seccionaron en cortes de 0.2-0.5µm y se colorearon con azul de toluidina (TBO), un colorante metacromático que permite detectar tanto esporopolenina como lignina o sus precursores. Para estudios adicionales, secciones de 3-5µm de material incluido en paraplast plus se colorearon con safranina-verde rápido y azul alcian-hematoxilina. Las pruebas químicas se llevaron a cabo en secciones de esporangios sin fijar en diferentes etapas de madurez utilizando azul alcian (mucopolisacáridos), solución de Lugol (almidón), Sudán III (lípidos), fluoroglucinol (lignina) y orceína (cromosomas). Las observaciones se efectuaron con microscopio fotónico equipado con contraste diferencial de interferencia (DIC) y microscopía de fluorescencia (para esporas y pared de los esporangios sin

colorear). Para observaciones con microscopía electrónica de barrido (MEB), los estróbilos y esporangios se deshidrataron con 2,2 dimetoxipropano, se desecaron a punto crítico y se metalizaron con oro. Los resultados indican que la ontogenia de los esporangios y esporogénesis es muy similar a la observada previamente en *Huperzia brevifolia*. En las primeras etapas de desarrollo, las paredes celulares de la epidermis del esporangio se cutinizan y en las finales se lignifican. En el desarrollo del esporoderma, la primera capa que se forma es el exosporio, compuesto por esporopolenina. El endosporio es una capa interna delgada compuesta de celulosa, pectina y polisacáridos carboxilados. El perisporio, si está presente, es la última capa que se deposita. Los mucopolisacáridos se encontraron en la cubierta del esporocito, son abundantes en la cavidad esporangial hasta la etapa de tétradas inmaduras y luego desaparecen. Los lípidos son abundantes en esporocitos, tétradas y esporas, y representan la principal fuente de energía de estas. En contraste, el almidón no se detecta en las esporas pero es abundante en esporocitos premeióticos y tétradas inmaduras, ambos con gran actividad metabólica. La fluorescencia intrínseca corrobora la presencia de lignina y cutina en la pared del esporangio, mientras que la esporopolenina se limita al exosporio. Las células de transfusión y el perisporio no siempre están presentes. Sin embargo, los procesos de la ontogenia y esporogénesis son extremadamente similares en todos los taxones estudiados, lo que sugiere que representan rasgos típicos de familia, no específicos ni genéricos.

Palabras clave: almidón, cutina, esporogénesis, esporopolenina, lignina, lípidos, Lycopodiaceae.

REFERENCIAS

- Arana, M. D. & Øllgaard, B. (2012). Revisión de las Lycopodiaceae (Embryopsida, Lycopodiidae) de Argentina y Uruguay. *Darwiniana*, 50(2), 266-295.
- Ariizumi, T. & Toriyama, K. (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 437-460.
- Ballesteros, D. (2011). Conservation of fern spores. In H. Fernandez, A. Kumar & M. A. Revilla (Eds.), *Working with ferns issues and applications* (pp. 165-172). New York, U.S.A.: Springer.
- Ballesteros, D. & Walters, C. (2007). Calorimetric properties of water and triacylglycerols in fern spores relating to storage at cryogenic temperatures. *Cryobiology*, 55, 1-9.
- Blackmore, S., Wortley, A. H., Skvarla, J. J., & Rowley, J. R. (2007). Pollen wall development in flowering. *New Phytologist*, 3, 483-498.
- Bruce, J. G. (1976 a). Comparative studies in the biology of *Lycopodium carolinianum*. *American Fern Journal*, 6(4), 125-137.
- Bruce, J. G. (1976 b). Development and distribution of mucilage canals in *Lycopodium*. *American Journal Botany*, 63(4), 481-491.
- Castro, A. J. & Clément, C. (2007). Sucrose and starch catabolism in the anther of *Lilium* during its development: a comparative study among the anther wall, locular fluid and microspore/pollen fractions. *Planta*, 225, 1573-1582.
- Clément, C., Laporte, P., & Audran, J. C. (1998). The locus content and tapetum during pollen development in *Lilium*. *Sex Plant Reproduction*, 11, 94-106.
- Christenhusz, M. J. M., Zhang, X. C., & Schneider, H. (2011). A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns. *Phyotaxa*, 19, 7-54.
- Cronk, Q. (2009). *The molecular organography of plants*. Oxford, England: Oxford University Press.
- Devi, Y. S. & Singh, P. K. (2011). Additional notes on spore morphology of two *Huperzia* (Lycopodiaceae) species and systematic significance. *Research Journal of Botany*, 6(2), 78-86.
- Domínguez, E., Mercado, J. A., Quesada, M. A., & Heredia, A. (1999). Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sex Plant Reproduction*, 12(3), 171-178.
- Eliseu, S. A. & Dinis, A. (2008). Ultrastructure and cytochemistry of *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) pollen grain. *Grana*, 47(1), 39-51.
- Furness, C. A., Rudall, P. J., & Sampson, B. F. (2002). Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 163(2), 235-260.
- Gabriel y Galán, J. M. & Prada, C. (2011). Pteridophyte spores viability. In H. Fernandez, H., A. S. Kumar & M. A. Revilla (Eds.), *Working with ferns issues and applications* (pp.193-205). New York, U.S.A.: Springer.
- Gemmrich, A. R. (1977). Fatty acid composition of fern spore lipids. *Phytochemistry*, 16(7), 1044-1046.
- Gensel, P. G. (1992). Phylogenetic relationships of the Zosterophylls and Lycopods: evidence from morphology, paleoecology, and cladistic methods of inference. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79(3), 450-473.
- Ghanem, M. E., Han, R., Classen, B., Quetin-Leclercq, J., Mahy, J. G., Ruan C., Qin P., Perez, F., & Lutts, S. (2010). Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 167(5), 382-392.
- Gola, E. M. (2008). Reproductive strategies of *Huperzia*. In E. Szcześniak & E. M. Gola (Eds.), *Club mosses, horsetails and ferns in Poland-resources and protection* (pp. 5-14). Wrocław, Poland: Polish Botanical Society & Institute of Plant Biology, University of Wrocław.

- Gullvag, B. M. (1969). Primary storage products of some pteridophyte spores - a fine structural study. *Phytomorphology*, 19, 82-92.
- Haines, A. (2003). The families Huperziaceae and Lycopodiaceae in New England. Bowdoin, U.S.A.: V.F. Thomas Co.
- Harper, L., Golubovskaya, I., & Cande, W. Z. (2004). A bouquet of chromosomes. *Journal of Cell Science*, 117, 4025-4032.
- Holub, J. (1964). *Lycopodiella*, nový rod radu Lycopodiales. *Preslia*, 36, 16-22.
- Holub, J. (1975). *Diphasiastrum*, a new genus in Lycopodiaceae. *Preslia*, 47, 97-110.
- Holub, J. (1983). Validation of generic names in Lycopodiaceae: with a description of a new genus *Pseudolycopodiella*. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 18, 439-442.
- Holub, J. (1985). Transfer of *Lycopodium* species to *Huperzia* with a note on generic classification in Huperziaceae. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 20, 67-80.
- Holub, J. (1991). Some taxonomic changes within Lycopodiales. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 26, 81-94.
- Ibars, A. M., Vilar, M., Iranzo, J., & Salvo, A. E. (1988). Sobre la distribución del almidón en las Lycopodiales. *Acta Botánica Malacitana*, 13, 141-150.
- Kenrick, P. & Crane, P. R. (1997). *The origin and early diversification of land plants: A cladistic study*. Washington, U.S.A.: Smithsonian Institution Press.
- Lellinger, D. B. (2002). A modern multilingual glossary for taxonomic pteridology. *Pteridologia*, 3, 1-263.
- Lellinger, D. B., & Taylor W. C. (1997). A classification of spore ornamentation in the Pteridophyta. In J. M. Camus, M. Gibby, & R. J. Johns (Eds.), *Pteridology in perspective* (pp. 33-42). Kew, England: Royal Botanic Gardens.
- Lugardon, B. (1990). Pteridophyte sporogenesis: a survey of spore wall ontogeny and fine structure in a polyphyletic plant group. In S. Blackmore & R. B. Knox (Eds.), *Microspores: evolution and ontogeny* (pp. 95-120). London, England: Academic Press.
- Majdoub, H., Picton, L., Le Cerf, D., & Roudesli, S. (2010). Water retention capacity of polysaccharides from prickly pear nopals of *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia litoralis*. *Journal of Polymers and the Environment*, 18(4), 451-458.
- Moran, R. C. (2004). *A natural history of ferns*. Portland, Oregon, U.S.A.: Timber Press.
- Murillo, M. T. & Harker, M. (1990). *Helechos y plantas afines de Colombia*. Bogotá, Colombia: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Jorge Álvarez Lleras. 12.
- Murillo, M. T. & Murillo, J. (1999). Pteridófitos de Colombia I. Composición y distribución de las Lycopodiaceae. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 23(86), 19-38.
- Murillo, M. T., Murillo, J., León, A., & Triana, L. A. (2008). *Los pteridófitos de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Biblioteca José Jerónimo Triana N° 18.
- Noblin, X., Rojas, N. O., Westbrook, J., Llorens, C., Argentina, M., & Dumais, J. (2012). The fern sporangium: A unique catapult. *Science*, 335, 1322.
- Øllgaard, B. (1975). Studies in Lycopodiaceae, I. Observations on the structure of the sporangium wall. *American Fern Journal*, 65(1), 19-27.
- Øllgaard, B. (1987). A revised classification of the Lycopodiaceae s. lat. *Opera Botanica*, 92, 153-178.
- Øllgaard, B. (1988). Lycopodiaceae. In G. Harling & L. Andersson (Eds.), *Flora of Ecuador* (pp.1-156). Vol. 33. Quito, Ecuador: Arlöv Berlings.
- Øllgaard, B. (1990). Lycopodiaceae. In K. Kubitzki (Ed.), *The Families and genera of vascular plants* (31-39). Vol. 1. Berlin, Germany: Springer.
- Øllgaard, B. (1992). Neotropical Lycopodiaceae-an overview. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79(3), 687-717.
- Øllgaard, B. (1996). Neotropical *Huperzia* (Lycopodiaceae)-distribution of species richness. In J. M. Camus, M. Gibby, & R. J. Johns (Eds.), *Pteridology in perspective* (pp. 93-100). London, England: Royal Botanical Gardens.
- Øllgaard, B. (2012a). Nomenclatural changes in Brazilian Lycopodiaceae. *Rodriguésia*, 63, 479-482.
- Øllgaard, B. (2012b). New combinations in Neotropical Lycopodiaceae. *Phytotaxa*, 57, 10-22.
- Øllgaard, B. & Windisch, P. G. (1987). Sinopse das licopodiáceas do Brasil. *Bradea*, 5, 1-43.
- Pacini, E. (2010). Relationships between tapetum, loculus, and pollen during development. *International Journal of Plant Sciences*, 171(1), 1-11.
- Pettitt, J. M. & Jeremy, A. C. (1974). The surface coats on spores. *The Biological Journal of the Linnean Society*, 6(3), 245-257.
- Piffanelli, P., Ross, J. H. E., & Murphy, D. J. (1998). Biogenesis and function of the lipid structures of pollen grains. *Sexual Plant Reproduction*, 11(2), 65-80.
- Pita P. B., De Menezes, N., & Prado, J. (2006). Morfologia externa e interna das folhas vegetativas, esporófilos e esporângios de espécies de *Huperzia* Bernh. (Lycopodiaceae-Pteridophyta) do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 29(1), 115-131.

- Raghavan, V. (1989). *Developmental biology of fern gametophyte*. Cambridge, England: Cambridge University.
- Randi, A. M. & Felipe, G. M. (1988). Mobilization of storage reserves during *Cyathea delgadii* spore germination. *Journal of Plant Research*, 101(4), 529-532.
- Renzaglia, K. S., Duff, R. J., Nickrent, D. L., & Garbary, D. J. (2000). Vegetative and reproductive innovations of early land plants; implications for a unified phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 355, 769-793.
- Rincón, B. E. J., Gélvez, L. V., Forero, H. G., Arrieta, P. D., & Hleap, J. S. (2009). Ontogenia del esporangio y esporogénesis del licopodio *Huperzia brevifolia* (Lycopodiaceae) de las altas montañas de Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 57(4), 1141-1152.
- Rolleri, C. H. (1972 a). Morfología comparada de las especies de "Lycopodium" (Pteridophyta-Lycopodiaceae) para el noroeste argentino. *Revista del Museo de La Plata*, 12, 223-317.
- Rolleri, C. H. (1972 b). Sobre la presencia y naturaleza de la endodermis en especies de *Lycopodium* L. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 14, 365-369.
- Rolleri, C. H. (1975). Acerca de los conductos glandulares en hojas de *Lycopodium alopecuroides* L Lycopodiaceae-Pteridophyta. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 16, 397-405.
- Rolleri, C. H. (1979). Análisis morfológico y revisión sistemática de las especies andino- patagónicas del género *Lycopodium* L. Lycopodiaceae-Pteridophyta. *Physis*, 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. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 19, 243-254.
- Rolleri, C. H. (1981). Sinopsis de las especies de *Lycopodium* L. (Lycopodiaceae Pteridophyta) de la sección *Crassistachys* Herter. *Revista del Museo de La Plata*, 12, 61-114.
- Rolleri, C. H. & Deferrari, A. M. (1986). Modelos epidérmicos y otros caracteres foliares en la sistemática y ecología de *Lycopodium* L., sección *Crassistachys* Herter. *Revista del Museo de La Plata*, 14(91), 65-79.
- 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. *Botanica Complutensis*, 34, 41-48.
- Ronceret, A. & Pawlowski, W. P. (2010). Chromosome dynamics in meiotic prophase I in plants. *Cytogenetic and Genome Research*, 129, 73-183.
- Ronceret, A., Sheehan, M., & Pawlowski, W. P. (2008). Chromosome dynamics in meiosis. In D. Verma & Z. Hong (Eds), *Cell Division Control in Plants* (pp. 103-124). Berlin/Heidelberg: Springer.
- Ruzin, S. E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. New York, U.S.A: Oxford University.
- Santa, J. (1986). Anatomía del tallo y suscripción genérica en Lycopodiaceae. *Actualidades Biológicas*, 15(58), 102-116.
- Schneller, J., Gerber, H., & Zuppiger, A. (2008). Speed and force of spore ejection in *Selaginella martensii*. *Botanica Helvetica*, 118(1), 13-20.
- Sersic, A. N. (1983). Ontogenia del esporangio y esporogénesis en *Lycopodium saururus* (Lycopodiaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 22(1-4), 205-220.
- Simpson, M. G. (2010). *Plant systematic* (2nd ed.). New York, U.S.A: Academic Press.
- Solé de Porta, N. & Murillo-Pulido, M. T. (2005). Estudio palino-botánico de algunas especies de pteridophyta de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 29(111), 183-218.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon*, 55(3), 705-731.
- Southworth, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 21(1), 73-80.
- Sykes, M. G. (1908). Notes on the morphology of the sporangium-bearing organs of the Lycopodiaceae. *New Phytologist*, 7(2-3), 41-60.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (5th ed.). Sunderland, U.S.A: Sinauer Associates, Inc.
- Tryon, A. F. & Lugardon, B. (1991). *Spores of the pteridophyta: Surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies* (1st ed.). New York, U.S.A: Springer.
- Tryon, R. & Tryon, A. (1982). *Ferns and allied plants with special reference to tropical America*. (1st ed.). New York, U.S.A: Springer.
- Tryon, R. M. & Stolze, R. G. (1994). Pteridophyta of Peru. Part VI. 22. Marsileaceae-21. Isoetaceae. *Fieldiana Botany*, 34, 1-123.
- Uehara, K. & Kurita, S. (1991). Ultrastructural study on spore wall morphogenesis in *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae). *American Journal Botany*, 78(1), 24-36.
- Wallace, S., Fleming, A., Wellman, C. H., & Beerling, D. J. (2011). Evolutionary development of the plant and spore wall. *AoB PLANTS*, 2011 1-18.
- Wagner, W. H. Jr. & Beitel, J. M. (1992). Generic classification of modern North American Lycopodiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79, 676-686.

- Wagner, W. H. Jr. & Beitel, J. M. (1993). Lycopodiaceae. In M. Windham (Ed.), *Flora of North America 1* (pp.18-37). New York, U.S.A: Oxford University Press.
- Webster, T. R. (1995). Demonstrating spore dispersal in the spikemoss, *Selaginella martensii*. *The American Biology Teacher*, 57(2), 83-86.
- Wellman, C. H., Gensel, P. G., & Taylor, W. A. (2009). Spore wall ultrastructure in the early lycopsid *Leclercqia* (Protolepidodendrales) from the lower devonian of North America: evidence for a fundamental division in the lycopsids. *American Journal of Botany*, 96(10), 1849-1860.
- Wikström, N. & Kenrick, P. (1997). Phylogeny of Lycopodiaceae (Lycopsidea) and the relationships of *Phylloglossum drummondii* Kunze based on *rbcl* sequences. *International Journal of Plant Sciences*, 58, 862-871.
- Wikström, N. & Kenrick, P. (2000). Phylogeny of epiphytic *Huperzia* (Lycopodiaceae): paleotropical and neotropical clades corroborated by plastid *rbcl* sequences. *Nordic Journal of Botany*, 20(2), 165-171.
- Wikström, P. & Kenrick, P. (2001). Evolution of Lycopodiaceae (Lycopsidea): estimating divergence times from *rbcl* gene sequences by use of nonparametric rate smoothing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(2), 177-186.
- Whittier, D. P. (1998). Germination of spores of the Lycopodiaceae in axenic culture. *American Fern Journal*, 88(3), 106-113.
- Whittier, D. P. (2003). Rapid Gametophyte Maturation in *Ophioglossum crotalophoroides*. *American Fern Journal*, 93(3), 137-145.
- Whittier, D. P. (2006). Gametophytes of four tropical, terrestrial *Huperzia* species (Lycopodiaceae). *American Fern Journal*, 96(2), 54-61.
- Whittier, D. P. & Webster, T. R. (1986). Gametophytes of *Lycopodium lucidulum* from axenic culture. *American Fern Journal*, 76(2), 48-55.
- Wilce, J. H. (1972). Lycopod spores, I. General spore patterns and the generic segregates of *Lycopodium*. *American Fern Journal*, 62(3), 365-79.
- Yatsentyuk, S. P., Valiejo-Roman, K. M., Samigullin, T. H., Wilkström, N., & Troitsky, A.V. (2001). Evolution of Lycopodiaceae inferred from spacer sequencing of chloroplast rRNA genes. *Russian Journal of Genetics*, 37(9), 1274-1280.