

Esporogénesis y esporas de *Equisetum bogotense* (Equisetaceae) de las áreas montañosas de Colombia

Edgar Javier Rincón-Baron¹, Gerardo Andrés Torres² & Cristina Hilda Roller³

1. Grupo de Estudios Botánicos y Docente del Instituto de Biología, Universidad de Antioquia (UdeA), calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia; ejrbaron@gmail.com
2. Unidad de Microscopía Electrónica, Profesor Departamento de Biología. Carrera 2 # 1A-25, Urbanización Caldas, Universidad del Cauca (UNICAUCA), Popayán, Colombia; gantorres@gmail.com
3. 1) Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática (LEAVES), Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 64 entre 120 y diagonal 113, B1904 DZB, La Plata. 2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina; crolleri@fcnym.unlp.edu.ar, tinar@speedy.com.ar

Recibido 06-VIII-2012. Corregido 12-XII-2012. Aceptado 22-I-2013.

Abstract: Sporogenesis and spores of *Equisetum bogotense* (Equisetaceae) from mountain areas of Colombia. Studies on some reproductive traits in *Equisetum* species are scarce and valuable to understand species distribution. Therefore, a detailed study of the sporogenesis process and spore development in *E. bogotense* is presented, with an analysis of the main events during meiosis, maturation of spores, spore wall ultrastructure, orbicules and elaters. Specimens were collected from 500 to 4500m in Cauca, Colombia. Strobili at different maturation stages were fixed, dehydrated, embedded in resin, and ultra-microtome obtained sections were stained with Toluidine blue. Observations were made with optical microscopy with differential interference contrast illumination technique (DIC), transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM). Ultrathin sections (70-80µm) for TEM observations were stained with uranyl acetate and lead citrate; while samples for SEM observations, were fixed, dehydrated in 2.2-dimethoxypropane and dried at critical point as in standard methods. Strobili have numerous mature sporangiophores, each one with a peltate structure, the scutellum, bearing five-six sessile sporangia attached to the axis of strobilus by the manubrium. Immature sporocytes (spore mother cells) are tightly packed within the young sporangia. The sporocytes quickly undergo meiosis, by passing the stage of archesporium and give origin to tetrads of spores. The tapetum loses histological integrity during early stages of sporogenesis, intrudes as a plasmodial mass into the cavity of the sporangium, partially surrounding premeiotic sporocytes, and then, tetrads and adult spores. The tapetum disintegrates towards the end of the sporogenesis, leaving spores free within the sporangial cavity. Spores present several cytological changes that allow them to achieve greater size and increase the number of plastids, before reaching the adult stage. Sporoderm includes three layers external to the cytoplasmic membrane of the spore cell, and they are pseudoendospore, exospore and perispore. Viewed with SEM, the exospore is smooth to rugulate, with micro perforations, while the perispore is muriform, rugate, with narrow, delicate, discontinuous, randomly distributed folds delimiting incomplete, irregular areolae, externally covered by of different size, densely distributed orbicules. These orbicules are also found all over the external face and margins of the elaters, while the internal face is smooth and lack orbicules. Viewed with TEM, the exospore is a thick layer of fine granular material, while perispore is a thinner layer of dense, separate orbicules. The elaters are composed by two layers of fibrillar material: an inner layer with longitudinally oriented fibrils and an outer, thicker and less dense layer with fibrils transversely fibrils and abundant, external orbicules. It is suggested that the processes of ontogeny and characters of the sporoderm are relatively constant in *Equisetum*; however, sporogenesis in *E. bogotense* is synchronous and this condition has been observed so far only in *E. giganteum*, a tropical genus also found in Colombia. Rev. Biol. Trop. 61 (3): 1067-1081. Epub 2013 September 01.

Key words: exospore, orbicules, perispore, spores, sporoderm ultrastructure, sporogenesis.



En las regiones montañosas de Colombia se encuentran tres especies de *Equisetum* L.: *E. bogotense* Kunth., *E. giganteum* L. y *E. myriochaetum* Schldl. & Cham. (Triana-Moreno & Murillo 2005, Murillo *et al.* 2008), citadas también para Centroamérica y Sudamérica (Moran 1995). *E. bogotense* crece en toda América tropical, desde Costa Rica hasta la Argentina (Tryon & Tryon 1982); es una planta palustre, de ambientes lóticos, lénticos y humedales que crece en zonas despejadas o protegidas, orillas de quebradas y bordes de barrancos sombríos y húmedos. Las tres especies viven en alturas similares en Colombia desde los 500 hasta los 4 500m (Murillo & Harker 1990), aunque *E. bogotense* es más común en las zonas de mayor altitud (Triana-Moreno & Murillo 2005, Murillo *et al.* 2008).

Los trabajos en el género *Equisetum* son abundantes y diversos. Pryer *et al.* (1995), Pryer *et al.* (2001), Des Marais *et al.* (2003), Guillon (2004, 2007), Carlquist & Schneider (2011), Kaufman *et al.* (1973), Chen & Lewin (1969), Ernst (1990), Epstein (1999), Holzhueter *et al.* (2003), Currie & Perry (2007, 2009) y Law & Exley (2011), entre otros, han analizado aspectos taxonómicos, sistemáticos, evolutivos y estructurales, además de la capacidad de *Equisetum* de biomineralizar sílice y acumularla en diversas partes del cuerpo vegetal.

Los estudios de aspectos reproductivos son más escasos y se relacionan con el desarrollo de los esporangios y la esporogénesis (Hawkins 1907), el proceso de maduración de las esporas, el patrón de depósito de las capas del esporodermo y la presencia de clorofila en las esporas (Beer 1909), la morfología y evolución de esporangióforos y ejes en relación con el origen y disposición de estas estructuras (Page 1972), aspectos ultraestructurales de la germinación de las esporas (Gullvåg 1968, Olsen & Gullvåg 1973), caracteres de forma, tamaño y color de las esporas en relación con su viabilidad en especies e híbridos (Duckett 1970), distribución de los orgánulos, en especial plastidios y mitocondrias, durante la meiosis (Bednara & Rodkiewicz 1985, Bednara *et al.* 1986), maduración de los esporangios, aspectos

ultraestructurales de la esporogénesis y morfogénesis de la pared de las esporas y los eláteres (Uehara & Kurita 1989), ultraestructura de los eláteres y la pared de las esporas (Tryon & Lugardon 1991), así como la disposición de los microtúbulos del tapete durante la esporogénesis y formación de cámaras plasmiales alrededor de las tétradas y esporas (Uehara & Murakami 1995). Finalmente, Roshchina *et al.* (2004), evaluaron la utilidad de la técnica de microscopía confocal en el estudio de la fisiología de las esporas y Rincón *et al.* (2011) investigaron la ontogenia de estróbilos y esporangios y la esporogénesis de *E. giganteum*.

Las orbículas fueron descubiertas por Rosanoff (1865) en polen de Leguminosas mimosoideas. Von Ubisch (1927) las describió en células del tapete de especies de *Oxalis* L. (Oxalidaceae) y fue el primero en señalar semejanzas en la naturaleza de esos corpúsculos con la exina de los granos de polen. Rowley (1962) introdujo el término corpúsculos de Ubisch y señaló que su forma podía ser variable. El término orbícula fue introducido por Erdtman *et al.* (1961). Madjd & Roland-Heydacker (1978) y Abadie & Hideux (1979) distinguieron entre corpúsculos de Ubisch (huecos) y orbículas (macizas pero deformables y generalmente esféricas), aunque consideraron ambos tipos compuestos por esporopolenina. Heslop-Harrison (1968, 1971) usó inicialmente el término placas y posteriormente se inclinó por el de orbículas. Hesse (1986) les atribuyó un valor diagnóstico similar al de la ornamentación, sobre la base del origen común del tapete y el tejido esporógeno. Los estudios sobre el valor diagnóstico de las orbículas en táxones de angiospermas y gimnospermas son muy numerosos (El-Ghazaly & Chaudhary 1993, Huysmans *et al.* 1998, Vinckier & Smets 2002, Ueno 1960a, 1960b, Yamazaki & Takeoka 1962). Con menos referencias, en briófitos fueron tratadas por Zajac (1995) y en helechos principalmente por Lugardon (1981), Tryon & Tryon (1982), Passarelli (2007) y Passarelli *et al.* (2010).

Este trabajo es un aporte al conocimiento de la esporogénesis, desarrollo de las esporas

y aspectos de la ultraestructura de la pared esporal, eláteres y orbículas de *E. bogotense*. Se presentan estudios detallados de ultraestructura de los principales sucesos ocurridos durante la meiosis, maduración de las esporas, morfología de la pared esporal y de los eláteres, y se analiza el origen, características y naturaleza de las orbículas presentes en los eláteres y el perisporio.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los meses de julio y agosto (época seca del año) 2011 se recolectaron para su estudio 30 ejemplares de *E. bogotense* en el municipio de Puracé- Coconuco, Cauca a 2° 20'29" N - 76° 29'45" W y 2 416m de altitud. El material de referencia se depositó en los Herbarios del Departamento de Biología de la Universidad del Valle (CUVC) y del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia (HUA) (002 Eb-Rincón). Los estróbilos del eje principal y las ramificaciones fueron ordenados por etapas de maduración; se establecieron arbitrariamente siete etapas y de cada una se estudiaron diez estróbilos y tres esporangióforos por cada estróbilo.

Para las observaciones con microscopio fotónico y MET el material se fijó en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato, pH 7.2 y 0.2M por 48h. Se lavó en el mismo buffer y se fijó adicionalmente con tetróxido de osmio al 2% por 4h a 6°C en la oscuridad y con agitación. Las muestras fijadas se lavaron con agua destilada y se deshidrataron a 6°C durante una hora en cada etapa de la serie de etanol y durante 12h en etanol 100%. Se embebieron en etanol-resina LR White (London Resin®,UK), a 6°C efectuándose varios cambios de resina pura durante seis días y en constante agitación (Chen & Baldwin 2007). La resina fue polimerizada a 60°C por 24h. Se obtuvieron secciones de 0.2-0.5µm con cuchillas de vidrio en ultra micrófomo Leica®, que se colorearon con azul de toluidina en bórax al 1% por 30-60min. Las preparaciones se observaron con microscopio fotónico de alta resolución Nikon® 80i eclipse equipado con contraste diferencial de

interferencia (DIC). Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital Nikon® DS- 2MV en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca. Se montaron también esporangios frescos y sin teñir, en diferentes etapas de maduración de las esporas, para comparaciones adicionales.

Las secciones ultrafinas de 70-80nm para MET, se obtuvieron con cuchilla de diamante y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo durante 40min y 5min respectivamente; se observaron con un microscopio JEOL JEM-1011 en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Para las observaciones con MEB el material se fijó y posteriormente deshidrató en 2.2 dimetoxipropano según Halbritter (1998) y se efectuó el secado a punto crítico con un desecador SAMDRI®-795. Los esporangióforos y las esporas se colocaron sobre una cinta conductiva de carbono de doble cara y fueron recubiertas con oro en una ionizadora DENTON VACUUM DESK IV durante 5min. Se observaron con un microscopio JEOL JSM-6490LV de la Escuela de Materiales de la Universidad del Valle (Cali).

Los términos utilizados para las esporas están en Lellinger (2002) y Punt *et al.* (2007). El término banda de orgánulos se utiliza según Brown & Lemmon (2001a), el de cámaras plasmodiales según Rincón *et al.* (2011) y orbículas, según Tryon & Lugardon (1991) y Passarelli *et al.* (2010).

RESULTADOS

Los estróbilos maduros del eje principal de *E. bogotense* alcanzan una longitud de 1.2 (±0.5)cm, y los de las ramas laterales 0.5(±0.3) cm. Presentan numerosos esporangióforos, constituidos por el escutelo, una estructura peltada que lleva de cinco a seis esporangios sésiles y que está unida por el manubrio al eje del estróbilo (Fig. 1 A-B).

En el interior de los esporangios inmaduros se encuentran, densamente dispuestas, las células madres de las esporas (esporocitos),

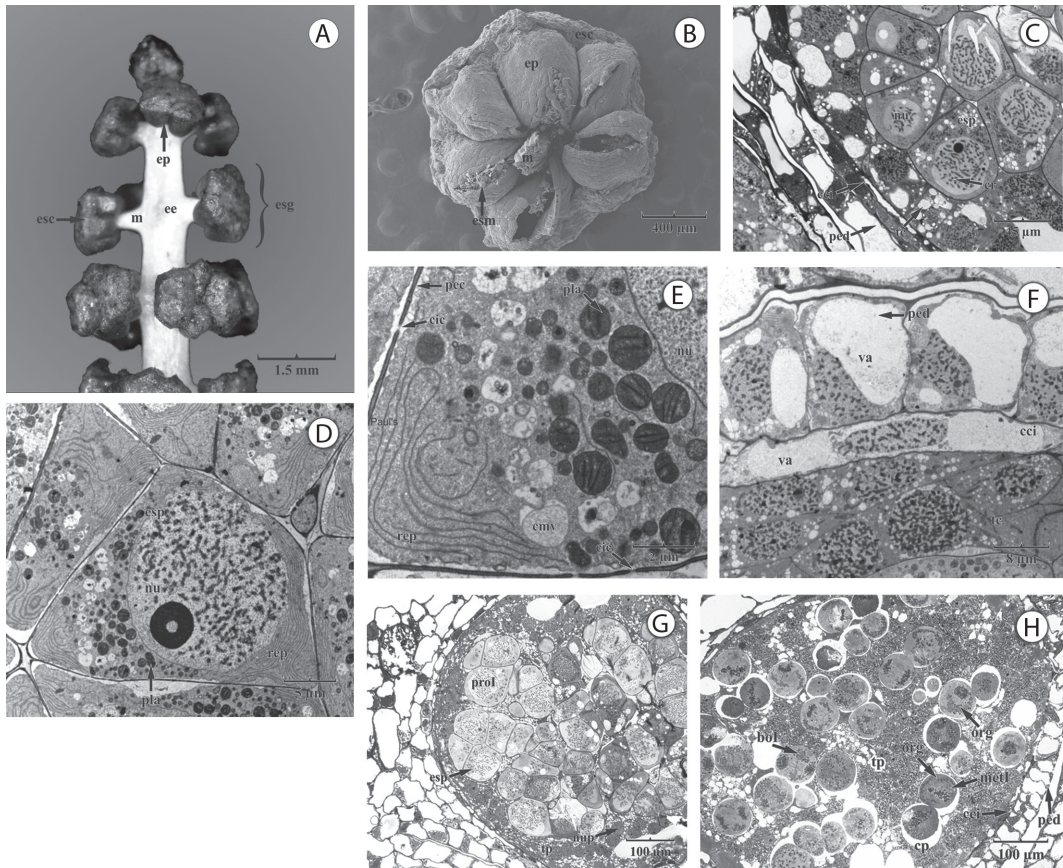


Fig. 1. Estróbilos, esporangióforos, esporangios, esporocitos y meiosis I de *E. bogotense*. **A.** Estróbilo con esporangióforos unidos a su eje central. **B.** Esporangióforos con manubrio unido a su eje y escutelo portador de esporangios. **C.** Esporocitos contenidos en la cavidad esporangial y tapete celular. **D-E.** Detalles de esporocitos. **F.** Pared del esporangio. **G-H.** Esporocitos en meiosis I. bol: banda de orgánulos de la meiosis I; cci: capa media; cic: canales de intercomunicación celular; cmv: cuerpos multivesiculares; cp: cámaras plasmodiales; cr: cromosomas; ee: eje del estróbilo; esm: esporas maduras; ep: esporangios; esc: escutelo; esg: esporangióforo; esp: esporocitos; m: manubrio; metl: metafase I; nu: núcleos; nup: núcleos del plasmodio; org: orgánulos; ped: pared definitiva del esporangio; pec: pared de los esporocitos; pla: plastidios; prof: profase I; rep: retículo endoplasmático; tc: tapete celular; tp: tapete plasmodial; va: vacuolas.

Fig. 1. Strobili, sporangiophores with the manubrium attached to its axis, and scutellum supporting the sporangia. **C.** Sporocytes within the sporangial cavity and cellular tapetum. **D-E.** Detail of sporocytes. **F.** Sporangium wall. **G-H.** Meiosis I in sporocytes, from prophase to anaphase. bol: band organelles, meiosis I; cci: inner layer; cic: cell intercommunication channels; cmv: multivesicular bodies; cp: plasmodial chambers; cr: chromosomes; ee: strobilus axis; esm: mature spore; ep: sporangia; esc: scutellum; esg: sporangiophore; esp: sporocyte; m: manubrium; metl: metaphase I; nu: nuclei; nup: plasmodium nuclei; org: organelles; ped: definitive sporangium wall; pec: sporocytes wall; pla: plastids; prof: prophase I; rep: endoplasmic reticulum; tc: cellular tapetum; tp: plasmodial tapetum; va: vacuoles.

que se caracterizan por presentar un núcleo central voluminoso, un nucléolo y cromosomas condensados (Fig. 1 C). El citoplasma es relativamente escaso y tiene aspecto granular por la existencia de abundantes plastidios, mitocondrias, cuerpos multivesiculares y un profuso

retículo endoplasmático; en las paredes de los esporocitos se aprecian múltiples canales de intercomunicación de hasta $0.21\mu\text{m}$ de ancho (Fig. 1 D-E).

En esta etapa de maduración, la pared del esporangio está constituida por tres capas:

externa, media e interna. La externa, uniestratificada, formará la pared definitiva del esporangio, integrada por células con núcleo grande eucromático en posición parietal, rodeado por numerosas vacuolas que ocupan la mayor parte del citoplasma, que incluye abundantes plastidios, mitocondrias y un denso retículo endoplasmático (Fig. 1 F). La interna, con hasta tres estratos celulares, formará el tapete, y sus células tienen contornos rectangulares o cuadrangulares, núcleo central grande, marcadamente eucromático y citoplasma escaso de aspecto granular con abundantes cuerpos multivesiculares, mitocondrias y plastidios (Fig. 1 F). Una capa media uniestratificada se sitúa entre las dos descritas y está integrada por células aplanadas, con núcleo de posición central, citoplasma escaso y vacuolas grandes.

El citoplasma de las células del tapete es considerablemente más electrodense en comparación con los esporocitos (Fig. 1 F), es decir, aparecen oscuros cuando los atraviesan los haces de electrones en el microscopio electrónico de transmisión. A medida que el esporangio madura el tapete pierde la integridad histológica y forma un plasmodio que invade la cavidad del esporangio entre los esporocitos, separándolos (Fig. 1 G). La invasión del tapete acelera el proceso de maduración de los esporocitos, que aumentan de tamaño y se tornan esféricos (Fig. 1 H). En esta etapa el tapete recubre toda la cavidad esporangial rodeando por completo a los esporocitos en las cámaras plasmodiales. La membrana nuclear de los esporocitos en profase se desintegra por completo, los cromosomas se hacen más evidentes, mientras que las mitocondrias y los plastidios se disponen periféricamente rodeando la zona donde se localizan los cromosomas (Fig. 1 H). Esta disposición de los orgánulos se mantiene hasta la metafase I, incluso es posible observar paquetes de microtúbulos que participan en el proceso de segregación cromosómica (Fig. 2 A), pero una vez que los cromosomas inician la separación, durante la anafase I, los orgánulos se agrupan en la placa metafásica formando la banda de orgánulos. Al final de la interfase la banda se localiza entre los dos

núcleos hijos (Fig. 2 B) y en ella se observan dos zonas diferentes y bien delimitadas: la región próxima a los dos núcleos celulares, con abundantes plastidios, que con microscopio fotónico se aprecian como estructuras de formas esféricas o elipsoidales, fuertemente coloreadas, y la región central de la banda, formada por material granular fino que apenas se colorea y que corresponde principalmente a las mitocondrias (Fig. 2 B). Estas características se aprecian también en las observaciones con MET (Fig. 2 C).

Durante la meiosis II, la banda de orgánulos mantiene su posición pero se torna más compacta y es difícil determinar la posición relativa de los plastidios y las mitocondrias (Figs. 2 D-F). A la disyunción de los cromosomas y la formación de los cuatro núcleos hijos le sigue la disgregación de los plastidios de la banda de orgánulos, que se desplazan en dirección de los núcleos de las esporas (Fig. 2 G). Las mitocondrias, en cambio, mantienen la posición, indicando los sitios de separación de las esporas. En estos sitios numerosas vesículas con material poco electrodense se depositan en la parte media de este agregado mitocondrial (Fig. 2 H) y posteriormente se fusionan iniciando la formación de la placa celular (Fig. 3 A). Con la agregación y fusión constante de vesículas, la placa celular se desarrolla de manera simultánea dividiendo a la célula en cuatro esporas inmaduras que se disponen tetraédricamente al final de la meiosis II (Fig. 3 B). Las tétradas pasan por varias etapas de maduración hasta la formación de las esporas adultas, que permanecen juntas en la misma cámara plasmodial pero se separan progresivamente hasta quedar en cámaras plasmodiales individuales.

Las esporas inmaduras son esféricas, con esporoderma poco definido, núcleo eucromático en posición central, uno o dos nucléolos, citoplasma con retículo endoplasmático denso, numerosos plastidios y mitocondrias (Fig. 3 C).

El tapete plasmodial presenta abundante retículo endoplasmático, numerosos plastidios y cuerpos multivesiculares, que ocasionalmente se observan en las cámaras plasmodiales (Figs. 3 D). En esta etapa también termina

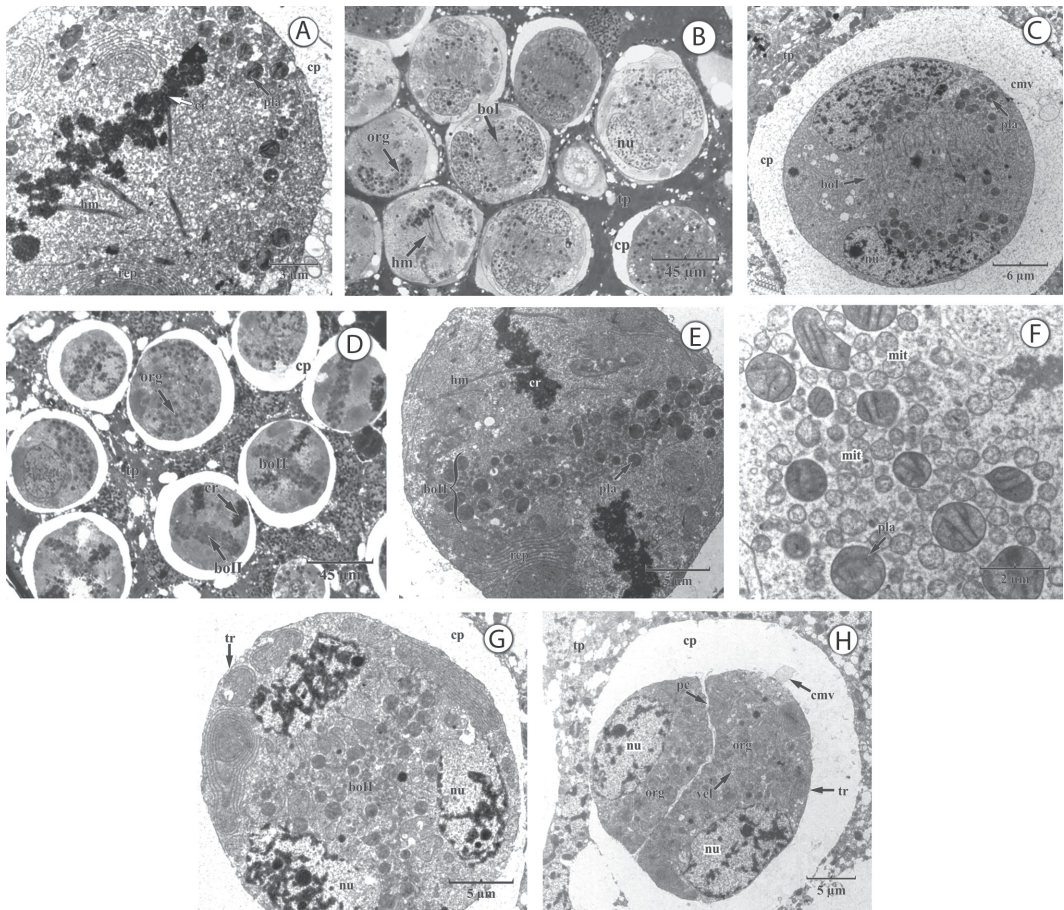


Fig. 2. Meiosis I-II e inicio de la formación de la placa celular de *E. bogotense*: detalles estructurales. **A.** Metafase I, cromosomas en la placa metafásica y orgánulos desplazados periféricamente. **B-C.** Final de la meiosis I, banda de orgánulos con plastidios cerca de los dos núcleos hijos y mitocondrias centrales; esporocitos localizados en cámaras plasmodiales individuales. **D-F.** Metafase II, banda orgánulos compacta, no estratificada. **G-H.** Depósito de vesículas y material brillante, no electrodenso que formará la placa celular. bol: banda de orgánulos de la meiosis I; bolII: banda de orgánulos de la meiosis II; cmv: cuerpos multivesiculares; cp: cámaras plasmodiales; cr: cromosomas; hm: fibras del huso meiótico; nu: núcleos; mit: mitocondrias; org: orgánulos; pc: placa celular; pla: plastidios; rep: retículo endoplasmático; tp: tapete plasmodial; tr: tétradas; vel: vesículas con material brillante, no electrodenso.

Fig. 2. Meiosis I-II and the beginning of the formation of the cell plate of *E. bogotense*: structural details. **A.** Metaphase I, chromosomes on the metaphasic plate and peripherally displaced organelles. **B-C.** End of meiosis I, organelle band with plastids near the two daughter nuclei, and central mitochondria; sporocytes included in individual plasmodial chambers. **D-F.** Metaphase II, compact unstratified organelles band. **G-H.** Deposit of vesicles, and bright, non electrodense material composing the cell plate. bol: band organelles of meiosis I; bolII: band organelles of meiosis II; cmv: multivesicular bodies; cp: plasmodial chambers; cr: chromosomes; hm: meiotic spindle fibers; nu: nuclei; mit: mitochondria; org: organelles; pc: cell plate; pla: plastids; rep: endoplasmic reticulum; tp: plasmodial tapetum; tr: tetrads; vel: vesicles with bright, non electrodense material.

de diferenciarse la pared definitiva del esporangio formada ahora sólo por dos estratos celulares. El externo será la pared definitiva del esporangio y está constituido por células que presentan engrosamientos en las paredes

anticlinales, periclinales internas y también con frecuencia en las externas. El estrato interno se caracteriza por células con citoplasma escaso, núcleos elipsoidales elongados casi picnóticos y grandes vacuolas (Fig. 3 E). Una vez que las

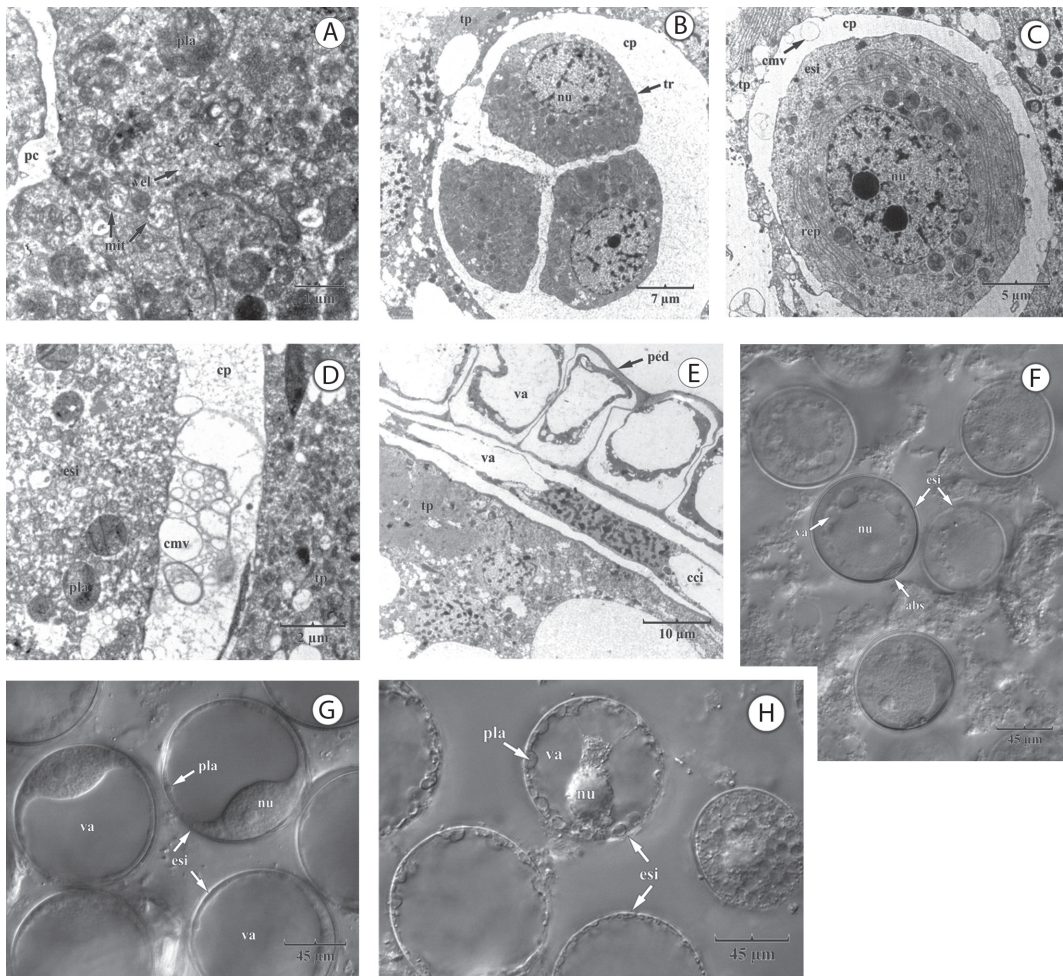


Fig. 3. Formación de la placa celular, tétradas, pared adulta del esporangio y maduración las esporas de *E. bogotense*. **A-B.** Fusión y depósito de vesículas de material brillante, no electrodenso, entre las mitocondrias más alejadas de la banda de orgánulos; separación simultánea de las esporas en la tétrada. **C-D.** Esporas inmaduras en cámaras plasmodiales individuales; abundantes cuerpos multivesiculares desplazándose entre el tapete plasmodial y las esporas. **E.** Pared adulta del esporangio, con dos estratos celulares y tapete plasmodial. **F-H.** Cambios citológicos durante la maduración de las esporas; formación y fusión de vacuolas, proliferación y migración de plastidios hacia el centro de la espora. abs: abertura esporal; cci: capainterna; cmv: cuerpos multivesiculares; cp: cámaras plasmodiales; esi: esporas inmaduras; mit: mitocondrias; nu: núcleos; pc: placa celular; ped: pared definitiva del esporangio; pla: plastidios; rep: retículo endoplasmático; tp: tapete plasmodial; tr: tétradas; va: vacuolas; vel: vesículas con material brillante, no electrodenso.

Fig. 3. Cell plate, tetrads and sporangium wall development, and maturation of adult spores of *E. bogotense*. **A-B.** Vesicle fusion and deposition of non electrodense material among mitochondria located farther away from the band of organelles; simultaneous separation of the spores in the tetrad. **C-D.** Immature spores in individual plasmodial chambers; abundant multivesicular bodies moving between plasmodial tapetum and spores. **E.** Adult sporangium wall, with two cell layers and plasmodial tapetum. **F-H.** Cytological changes during maturation of the spores; vacuole formation and fusion, proliferation and migration of plastids to the center of the spore cell. abs: spore aperture; cci: inner layer; cmv: multivesicular bodies; cp: plasmodial chambers; esi: immature spores; mit: mitochondria; nu: nuclei; pc: cell plate; ped: definitive sporangium wall; pla: plastids; rep: endoplasmic reticulum; tp: plasmodial tapetum; tr: tetrads; va: vacuoles; vel: vesicles with bright, non electrodense material.

esporas han madurado, el tapete plasmodial degenera y las esporas quedan libres en la cavidad esporangial.

En las observaciones de esporangios frescos sin teñir con la técnica de DIC se observa que las esporas pasan por varias etapas de maduración, con notable aumento de la vacuolización a medida que crecen. Inicialmente el núcleo se encuentra en posición central y está rodeado por varias vacuolas (Fig. 3 F) que posteriormente se fusionan formando una sola vacuola central que ocupa la mayor parte del citoplasma y desplaza al núcleo a una posición parietal (Fig. 3 G). Hay escasos plastidios alrededor del núcleo, que migran hacia el centro de la espóra al finalizar el proceso de maduración (Fig. 3 H).

Las esporas ya desarrolladas tienen un núcleo en posición central rodeado por numerosos cloroplastos y gránulos de almidón; son esféricas y el esporoderma consiste de dos capas: exosporio y perisporio y además presentan dos eláteres espatulados (Fig. 4 A-B). Con la maduración de las esporas y degradación del tapete plasmodial, la pared del esporangio se abre permitiendo la liberación de las esporas (Fig. 4 C).

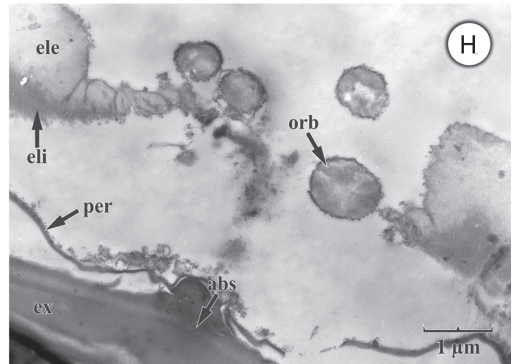
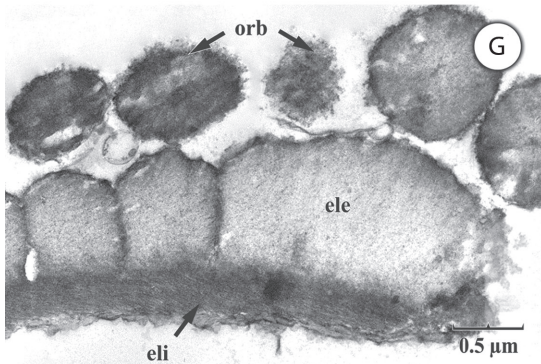
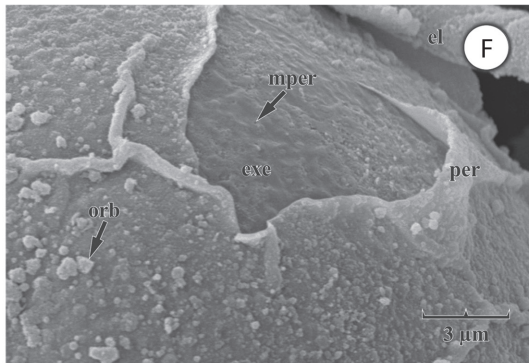
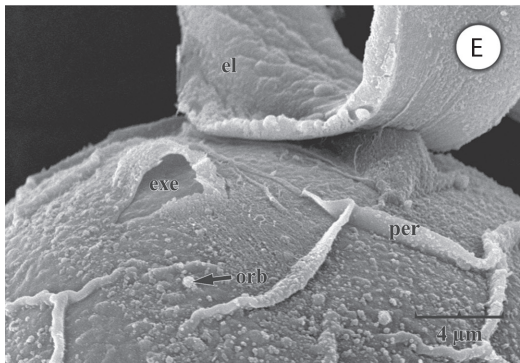
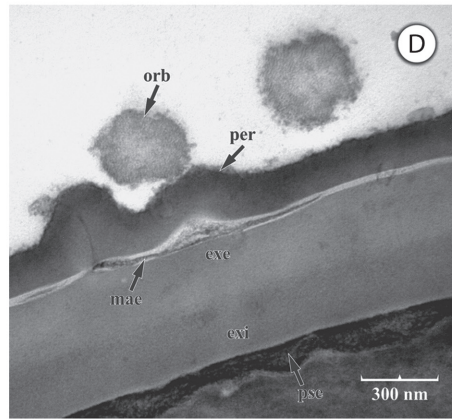
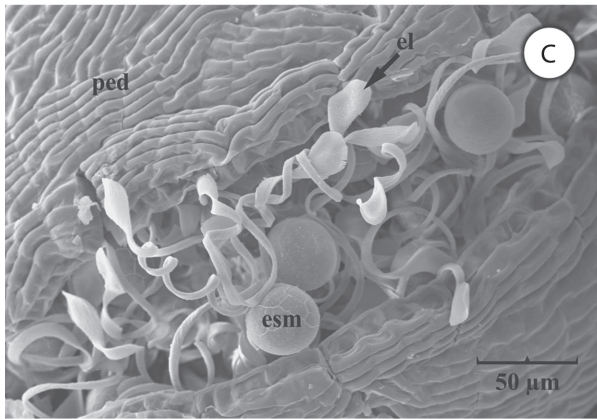
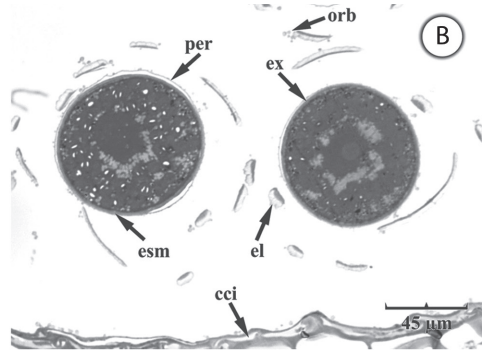
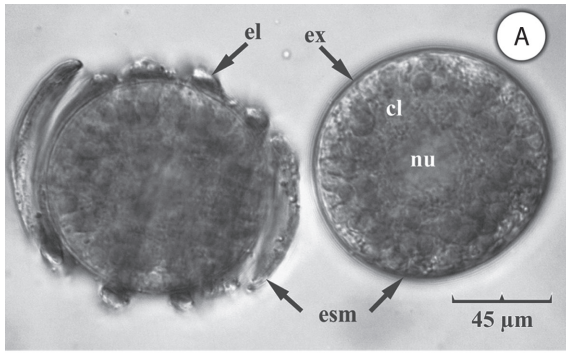
El exosporio se forma por el depósito de capas de esporopolenina que determinan dos zonas homogéneas de material granular que se diferencian en textura y contraste. El exosporio carece de orbículas y el pseudoendosporio se

localiza inmediatamente debajo del exosporio, formando una capa irregular de material fibroso a granular electrodenso, que se deposita al final de la maduración de la espóra y limita internamente con la membrana celular. Aparecen pequeños depósitos de material granular fino estrechamente asociado a la superficie externa del exosporio, con características similares de textura y contraste y originan protuberancias o microverrugos en la superficie de esta pared de la espóra (Fig. 4 D). El perisporio es delgado, de 0.15-0.16 μm y está constituido por una fina capa de esporopolenina electrodenso que se localiza por encima del exosporio. Externamente presenta abundantes orbículas esféricas de diámetro variable, entre 0.11 y 0.38 μm , constituidas por material granular fino, que se organiza en dos zonas: una superficial de poco contraste y una interna poco electrodenso (Fig. 4 D). En la superficie externa, el perisporio está ornamentado, es muriforme, rugado, con pliegues finos y afilados, bajos, discontinuos, que se distribuyen irregularmente delimitando aréolas completas o incompletas y con abundantes orbículas (Fig. 4 E). En tanto que el exosporio es de apariencia rugulado o verrucoso y con microperforaciones superficiales (Fig. 4 F).

Los eláteres, vistos con MET, están constituidos por dos capas de material fibrilar: una interna delgada, formada con fibrillas orientadas paralelamente al eje mayor de la estructura y una externa más gruesa y menos electrodenso

Fig. 4. Dehiscencia del esporangio y caracteres de las esporas adultas de *E. bogotense*. **A-B.** Tapete ya desintegrado y esporas maduras, con núcleo, abundantes plastidios en el citoplasma, exosporio, perisporio y eláteres. **C.** Esporas maduras con eláteres espatulados, al salir de los esporangios. **D.** Corte transversal del esporoderma, con pseudoendosporio, exosporio, perisporio y orbículas. **E-F.** Detalle de la ornamentación del perisporio y el exosporio. **G.** Corte longitudinal de los eláteres, con dos capas y orbículas. **H.** Detalle de la abertura esporal en el sitio de unión del perisporio y los eláteres. abs: abertura esporal; cci: capa interna; cl: cloroplastos; el: eláteres; ele: capa externa del eláter; eli: capa interna del eláter; esm: espóra madura; ex: exosporio; exe: capa externa del exosporio; exi: capa interna del exosporio; mae: material electrodenso; mper: microperforaciones del exosporio; nu: núcleo; per: perisporio; ped: pared definitiva del esporangio; orb: orbículas; pse: pseudoendosporio.

Fig. 4. Dehiscence of sporangium and characters of adult spores of *E. bogotense*. **A-B.** Collapsed tapetum, and adult spores with nuclei, abundant plastids in the cytoplasm, exospore, perispore, and elaters. **C.** Adult spores with spatulate elaters releasing from sporangium. **D.** Transversal section of sporoderm, with pseudoendospore, exospore, perispore and orbicules. **E-F.** Detail of ornamentation of perispore and exospore. **G.** Longitudinal section of elaters, with two layers and orbicules. **H.** Detail of the spore aperture at the binding site of the perispore and elaters. abs: spore opening; cci: inner layer; cl: chloroplasts; el: elaters; ele: elater outer layer; eli: elater inner layer; esm: mature spore; exe: exospore; exi: exospore outer layer; mae: electrodense material; mper: microperforations the exospore; nu: nucleus; per: perispore; ped: definitive sporangium wall; orb: orbicules; pse: pseudoendospore.



de material fibrogranular y con abundantes orbículas sobre la cara externa (Fig. 4 G). Los eláteres se unen a la espora, junto con el perisporio, en la zona de la abertura esporal; una región del exosporio de forma biconvexa, localizada en el sitio de unión de las esporas en la tétrada, es decir en la cara proximal de las esporas (Fig. 4 H).

DISCUSIÓN

La esporogénesis, la morfología de los esporocitos, el proceso de formación de la pared esporangial, el tapete, los eláteres y el tipo de esporoderma adulto fueron analizados en especímenes de *E. bogotense* procedentes de las áreas montañosas de Colombia. La esporogénesis es sincrónica, una condición similar a la que presentan *E. arvense* L. (Uehara & Kurita 1989) y *E. giganteum* (Rincón *et al.* 2011), mientras que para *E. fluviatile* L. se conoce esporogénesis asincrónica (Lehmann *et al.* 1984).

La morfología de los esporocitos, el proceso de formación de la pared esporangial y el tapete de *E. fluviatile*, *E. arvense*, *E. giganteum* y *E. bogotense* son similares (Lehmann *et al.* 1984, Uehara & Kurita 1989, Rincón *et al.* 2011), lo que sugiere que los procesos ontogenéticos que llevan a la formación de la pared esporangial y disposición de los esporocitos premeióticos en el esporangio son condiciones típicas de *Equisetum* y no caracteres específicos.

Lehmann *et al.* (1984) y Uehara & Kurita (1989) caracterizaron los esporocitos de *E. arvense* y *E. fluviatile* y describieron una ultraestructura típica de células con alta actividad metabólica, con presencia de un profuso retículo endoplasmático, gran cantidad de plastidios, mitocondrias, cuerpos multivesiculares y en la pared, múltiples canales de intercomunicación de hasta 0.2µm de diámetro, más amplios que típicos plasmodios y sin desmotúbulos, tal como se ha visto aquí para *E. bogotense*, una condición que no sería exclusiva de las equisetáceas ya que ha sido observada en células madres de los granos

de polen de varios táxones de angiospermas y gimnospermas en el momento de iniciarse la microsporogénesis y que se relacionarían con la sincronización del desarrollo o bien con fenómenos de citomixis (Heslop-Harrison 1966, Cresti *et al.* 1992, Bellucci *et al.* 2003, Guzicka & Wozny 2005, Ghaffari 2006, Mursalimov & Deineko 2011).

El tapete de *E. bogotense*, inicialmente celular y luego plasmodial, es similar al descrito para otras especies de *Equisetum* (Uehara & Kurita 1989, Lugardon 1990, Uehara & Murakami 1995) y para otros táxones de plantas (Pacini *et al.* 1985, Pacini 1997, Cresti *et al.* 1992, Furness & Rudall 1998, 2001, Furness 2008). Rincón *et al.* (2011) señalaron que en *E. giganteum* el tapete plasmodial invade sólo parcialmente la cavidad del esporangio cuando los esporocitos inician la meiosis I. En *E. bogotense*, el tapete pierde su integridad histológica en una etapa más temprana del proceso de esporogénesis e incluso es posible que la invasión del tapete estimule la maduración y posterior división reduccional de los esporocitos. En la meiosis I los esporocitos de *E. bogotense* están totalmente rodeados por el tapete plasmodial, encerrados en las cámaras plasmodiales individuales, de modo similar a lo descrito para *E. arvense* (Uehara & Kurita 1989) y *E. fluviatile* (Lehmann *et al.* 1984), mientras que en *E. giganteum* el tapete invade totalmente la cavidad de los esporangios hasta la formación y maduración de las tétradas (Rincón *et al.* 2011). Los movimientos del tapete y la formación de las cámaras plasmodiales también son similares a lo descrito para *Psilotum nudum* (L.) P. Beav. (Psilotaceae) por Parkinson (1987). La posibilidad de que estas cámaras sean resultado del proceso de fijación fue descartada tanto en *E. giganteum* (Rincón *et al.* 2011) como en *E. bogotense*. Se las considera estructuras fundamentales para el desarrollo de las tétradas en maduración y es posible que intervengan sustancias complejas como mucílagos, que facilitarían el paso de los cuerpos multivesiculares que se observan ocasionalmente durante la esporogénesis de *E. bogotense*. Rincón *et al.* (2011) observaron

que una vez que el tapete se desintegra sólo permanece una capa de células de apariencia picnótica, más o menos adherida a la pared del esporangio, condición que también se vio en *E. bogotense* aunque esa capa ya se observa antes de la degradación completa del tapete. No existen referencias sobre esta capa “remanente” para otras especies de *Equisetum*.

Los procesos relacionados con el movimiento de los orgánulos, la formación de la banda de orgánulos y su posterior separación entre las cuatro esporas resultantes al final de la meiosis son características de la meiosis esporica típica de las plantas y se han registrado en musgos, helechos, algunas gimnospermas, como *Ginkgo biloba* L. y angiospermas (Wolniak 1976, Marengo 1977, Sheffield & Bell 1979, Bell 1981, Brown & Lemmon 1988, 1990, 1991a-b, 2001a-b, Tchórzewska & Bednara 2011). La banda de orgánulos es variable en relación con la forma y distribución de sus componentes. En especies monoplastidiales con polaridad plastidial, está constituida solamente por mitocondrias, pequeñas vacuolas y ocasionalmente lípidos, mientras que en especies poliplastidiales incluye plastidios. Esta última es la condición observada en *Equisetum*. Esta banda de orgánulos permitiría el reparto equitativo de estos elementos celulares entre las células posmeióticas y además, dado que se presenta por lo general en especies con esporogénesis o microsporogénesis de tipo simultáneo, podría evitar interferencias entre los husos meióticos durante la meiosis II (Bednara *et al.* 1986). En plantas con esporogénesis simultánea hay depósitos y agregados de vesículas con material poco electrodens, en posiciones citoplasmáticas determinadas por la presencia de agregados mitocondriales y es en estos sitios donde se formarán las placas celulares antes de la separación de las cuatro esporas en disposición tetraédrica dentro de la tétrada (Lehmann *et al.* 1984, Bednara & Rodkiewicz 1985, Bednara *et al.* 1986, Brown & Lemmon 1990, Brown & Lemmon 1991b) una condición que también ese observó en *E. bogotense*.

A diferencia de licófitos y helechos, las células de la pared del esporangio maduro de

E. bogotense presentan diferentes grados de engrosamiento en todas sus caras pero no diferenciales en forma de “U”, por lo que es posible que la pared esporangial de *Equisetum* no contribuya para la dispersión de las esporas, sino que este proceso esté basado en la presencia y eficiencia de los eláteres (Pacini & Franchi 1993, Rincón *et al.* 2011).

Marengo (1949), Marengo & Badalamente (1978) y Raghavan (1989) describieron los cambios citoplasmáticos durante la maduración de las esporas del helecho *Onoclea sensibilis* L. (Onocleaceae), señalando que las esporas inmaduras presentan un núcleo central rodeado por numerosas vacuolas que se fusionan y gradualmente ocupan la mayor parte del volumen celular, relegando al núcleo y al citoplasma a una posición parietal, al mismo tiempo que los plastidios provenientes de proplastidios aumentan en número y rodean totalmente al núcleo. Sería necesario ampliar estas observaciones para otras especies de equisetos y helechos, ya que de generalizarse, podría considerarse como un argumento más a favor de la afinidad de *Equisetum* con los grupos megafilicos.

No existe acuerdo en el nombre que debe aplicarse a la delgada capa de material fibrogranular que separa la membrana citoplasmática del exosporio en las esporas maduras de *Equisetum*. Uehara & Kurita (1989) la llaman intina en el caso de *E. arvense*; Kedves & Párdutz (1998) generalizan el término endosporio, mientras que Lugardon (1990) y Tryon & Lugardon (1991) utilizan pseudoendosporio para diferenciarla del endosporio propiamente dicho que, en *Equisetum* se formaría cuando la espora inicia la germinación (Gullvåg 1968, Lugardon 1990, Tryon & Lugardon 1991). Aquí se designa esta capa como pseudoendosporio, debido a que se forma al final de la esporogénesis y no durante la germinación de las esporas, como el endosporio. Así, se concluye que el esporoderma de las esporas de *E. bogotense* consiste de pseudoendosporio, exosporio y perisporio.

El exosporio adulto está constituido por dos capas de similar espesor, aunque la capa interna es más electrodensa que la externa.

Esta condición coincide con lo descrito para *E. arvense* (Uehara & Kurita 1989), *E. ramosissimum* Desf. y *E. palustre* L. (Lugardon 1990, Tryon & Lugardon 1991). Uehara & Kurita (1989) utilizaron los términos exina interna y exina externa para referirse a las dos capas del exosporio, términos que aquí no se han utilizado por considerarlos más adecuados para granos de polen.

Entre el exosporio y el perisporio de *E. bogotense* se observó una delgada capa irregular de material electrodenso. Fue registrada por Tryon & Lugardon (1991) en *E. ramosissimum* y *E. palustre* y por Kedves & Párdutz (1998) en *E. arvense* y considerada por éstos últimos como parte del exosporio. Las observaciones efectuadas en *E. bogotense* coinciden con estos autores; además esta capa de material es la responsable de la micro-ornamentación presente en la capa externa del exosporio de las esporas maduras de *E. bogotense*.

Las orbículas de *E. bogotense* son cuerpos esféricos macizos formados por esporopolenina, que se originan a partir del tapete y se depositan juntamente con el perisporio, mientras que el exosporio carece de orbículas. En helechos se ha citado su presencia sobre la superficie del exosporio y del perisporio y se han considerado similares a esas capas en origen y naturaleza. Lugardon (1981) las llamó glóbulos y luego, Tryon & Lugardon (1991) diferenciaron glóbulos, producidos por el tapete al mismo tiempo que el exosporio, de esférulas u orbículas, formadas juntamente con el perisporio. Passarelli (2007) y Passarelli *et al.* (2010) las describieron en especies de *Blechnum* (Blechnaceae) y pese a diferencias en el tamaño, las designaron orbículas por originarse del tapete y en conjunto con el perisporio. Están presentes también en otros géneros de helechos, como *Platyserium* Desv., *Drynaria* (Bory) Sm., *Christiopteris* Copel. y *Polypodium* L. (Tryon & Lugardon 1991). Por lo observado en *E. bogotense* y otras especies del género, corresponde aplicar el término orbículas, dado que éstas se forman a partir del tapete juntamente con el perisporio y los eláteres, hacia el final del proceso de esporogénesis

y consisten de esporopolenina. El término orbículas se considera sinónimo de otros previos, como cuerpos de Ubisch (Rowley 1962) y glóbulos (Lugardon 1981).

Tryon & Lugardon (1991) clasificaron los eláteres de *Equisetum* en dos tipos según la forma del ápice: truncada, como el que se presenta en *E. bogotense* y atenuada como en *E. hyemale* e indicaron que están constituidos por dos capas fibrilares: una interna con fibrillas en disposición longitudinal y otra externa con fibrillas dispuesta transversalmente y menos electrodenso. Esta caracterización de los eláteres también fue descrita por Uehara & Kurita (1989) para *E. arvense* y por Lugardon (1990) para *E. ramosissimum* y *E. palustre*. Los autores mencionados coinciden en que los eláteres se unen al perisporio en la zona de la apertura esporal. Conclusiones previas sobre la morfología, ultraestructura y la disposición de los eláteres en relación al perisporio de *E. bogotense* se han confirmado aquí y es similar a las descripciones hechas para otras especies de *Equisetum*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las siguientes instituciones y personas: Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia (UdeA), Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca (UNICAUCA), Laboratorio de Microscopía Eléctrica de Barrido de la Escuela de Materiales (UNIVALLE), Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL-Sede Palmira), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Buenos Aires, Argentina), Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, a Efrén Muñoz y Lyda Patricia Mosquera, biólogos especialistas en microscopía electrónica, Ricardo Callejas y Fernando Alzate Guarín (Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia, UdeA), responsables de la lectura crítica y sugerencias hechas al manuscrito final.

RESUMEN

Los estudios sobre aspectos reproductivos son escasos en *Equisetum*. Por eso, hemos realizado un análisis detallado del proceso de esporogénesis, desarrollo de las esporas, ultraestructura de procesos que tienen lugar durante la meiosis, formación de la pared esporal, orbículas y eláteres de *E. bogotense*, en especímenes procedentes del Cauca, Colombia. Los estudios se efectuaron mediante microscopía fotónica, electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM). Los estróbilos llevan numerosos esporangióforos maduros, cada uno con un escutelo peltado, unido al eje del estróbilo por el manubrio y portador de 5-6 esporangios sétiles. Los esporocitos experimentan meiosis dando origen a tétradas de esporas. El tapete pierde la integridad histológica en las primeras etapas de esporogénesis y rodea los esporocitos premeióticos, posteriormente a las tétradas y finalmente las esporas inmaduras, que experimentan cambios citológicos y de tamaño antes de alcanzar la etapa adulta. El esporoderma de las esporas adultas de *E. bogotense* consiste de pseudoendosporio, exosporio y perisporio. Vistos con MEB, el exosporio de las esporas adultas es liso a rugulado con microperforaciones y el perisporio es muriforme, rugado, con pliegues delicados, estrechos, discontinuos, que se distribuyen al azar y delimitan aréolas incompletas. Externamente el perisporio está cubierto por orbículas, que se forman también en la cara externa y los márgenes de los eláteres. Vistos con TEM, el exosporio es una capa de material granular fino y el perisporio, una capa mucho más delgada con orbículas discretas. Los eláteres están formados por dos capas de naturaleza fibrilar, orientadas longitudinalmente y transversalmente. La esporogénesis en *E. bogotense* es sincrónica, similar a la de *E. giganteum*, otra especie de distribución tropical que también crece en Colombia.

Palabras clave: esporogénesis, esporas, exosporio, orbículas, perisporio, ultraestructura del esporoderma.

REFERENCIAS

Abadie, M. & M. Hideux. 1979. L'anthere de *Saxifraga cymbalaria* L. ssp. *huetiana* (Boiss.) Engl. e Irmisch., en microscopie électronique (M.E.B. et M.E.T.). 1. Généralités. Ontogenèse des orbicules. Ann. Sci. Nat. Bot. 1: 199-233.

Beer, R. 1909. The development of the spores of *Equisetum*. New Phytol. 8: 261-266.

Bednara, J. & B. Rodkiewicz. 1985. Distribution of plastids and mitochondria during sporogenesis in *Equisetum hyemale*, p. 17-19. In M.T.M. Willemse & J.L. Went (eds.). Sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses. Wageningen, Pudoc, Payses Bajos.

Bednara, J., I. Gielwanowska & B. Rodkiewicz. 1986. Regular arrangements of mitochondria and plastids

during sporogenesis in *Equisetum*. Protoplasma 130: 145-152.

Bell, P.R. 1981. Megasporogenesis in heterosporous fern: features of the organelles in meiotic cells and young megaspores. J. Cell Sci. 51: 109-119.

Bellucci, M., C. Roscini & A. Mariani. 2003. Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. J. Hered. 94: 512-516.

Brown, R.C. & B.E. Lemmon. 1988. Sporogenesis in bryophytes. Adv. Bryology 3: 159-223.

Brown, R.C. & B.E. Lemmon. 1990. Sporogenesis in bryophytes, p. 55-94. In S. Blackmore & R.B. Knox (eds.). Microspores: evolution and ontogeny. Academic, Londres, Inglaterra.

Brown, R.C. & B.E. Lemmon. 1991a. The cytokinetic apparatus in meiosis: control of division plane in the absence of a preprophase band of microtubules, p. 259-273. In C. Lloyd (ed.). The cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic, Londres, Inglaterra.

Brown, R.C. & B.E. Lemmon. 1991b. Sporogenesis in simple land plants, p. 9-24. In S. Blackmore & S.H. Barnes (eds.). Pollen and spores: patterns of diversification. Clarendon, Oxford, Inglaterra.

Brown, R.C. & B.E. Lemmon. 2001a. Sporogenesis in eusporangiate ferns: II. Polyplastidic Meiosis in *Ophioglossum* (Ophioglossales). J. Plant Res. 114: 237-246.

Brown, R.C. & B.E. Lemmon. 2001b. Sporogenesis in eusporangiate ferns. I. Monoplastidic meiosis in *Angiopteris* (Marattiales). J. Plant Res. 114: 223-235.

Carlquist, S. & E.L. Schneider. 2011. *Equisetum* xylem: SEM studies and their implications. Amer. Fern J. 101: 133-141.

Chen, C.H. & J. Lewin. 1969. Silicon as a nutrient element for *Equisetum arvense*. Can. J. Bot. 47: 125-131.

Chen, W. & T.C. Baldwin. 2007. An improved method for the fixation, embedding and immunofluorescence labeling of resin-embedded plant tissue. Plant Mol. Biol. Rep. 25: 27-35.

Cresti, M., S. Blackmore & J.L. van Went. 1992. Atlas of sexual reproduction in flowering plants. Springer, Berlín, Alemania.

Currie, H.A. & C.C. Perry. 2007. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. Ann. Bot. 100: 1383-1389.

Currie, H.A. & C.C. Perry. 2009. Chemical evidence for intrinsic 'Si' within *Equisetum* cell walls. Phytochemistry 70: 2089-2095.

Des Marais, D.L., A.R. Smith, D.M. Britton & K.M. Pryer. 2003. Phylogenetic relationships and evolution of extant horsetails, *Equisetum*, based on chloroplast DNA sequence data (*rbcL* and *trnL-F*). Int. J. Plant Sci. 164: 737-751.

- Duckett, J.G. 1970. Spore size in the genus *Equisetum*. *New Phytol.* 69: 333-346.
- El-Ghazaly, G. & R. Chaudhary. 1993. Morphology and taxonomic application of orbicules (Ubisch Bodies) in the genus *Euphorbia*. *Grana* 32: 26-32.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Phys.* 50: 641-664.
- Erdtman, G., E. Berglund & J. Pragłowski. 1961. An introduction to a Scandinavian pollen flora. *Grana* 2: 3-86.
- Ernst, W.H.O. 1990. Ecophysiology of plants in water-logged soil. *Aquat. Bot.* 38: 73-90.
- Furness, C.A. 2008. A review of the distribution of plasmoidal and invasive tapeta in eudicots. *Int. J. Plant Sci.* 169: 207-223.
- Furness, C.A. & P.J. Rudall. 1998. The tapetum and systematics in monocotyledons. *Bot. Rev.* 64: 201-239.
- Furness, C.A. & P.J. Rudall. 2001. The *tapetum* in basal angiosperms: early diversity. *Int. J. Plant Sci.* 162: 375-392.
- Ghaffari, G.M. 2006. Occurrence of diploid and polyploidy microspores in *Sorghum bicolor* (Poaceae) is the result of cytomixis. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1450-1453.
- Guillon, J.M. 2004. Phylogeny of Horsetails (*Equisetum*) based on the chloroplast rps4 gene and adjacent non coding sequences. *Syst. Bot.* 29: 251-259.
- Guillon, J.M. 2007. Molecular phylogeny of horsetails (*Equisetum*) including chloroplast atpB sequences. *J. Plant Res.* 120: 569-574.
- Gullvåg, M. 1968. On the fine structure of the spores of *Equisetum fluviatile* var. *verticillatum* studied in the quiescent, germinated and non-viable state. *Grana* 8: 23-69.
- Guzicka, M. & A. Wozny. 2005. Cytomixis in shoot apex of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Trees* 18: 722-724.
- Halbritter, H. 1998. Preparing living pollen material for scanning electron microscopy using 2,2-dimethoxypropane (DMP) and critical-point drying. *Biotech. Histochem.* 73: 137-143.
- Hawkins, L.A. 1907. The development of the sporangium of *E. hyemale*. *Ohio naturalist* 7: 122-128.
- Heslop-Harrison, J. 1966. Cytoplasmic connections between angiospermmeiocytes. *Ann. Bot.* 30: 221-230.
- Heslop-Harrison, J. 1968. Pollen wall development. *Science* 161: 230-237.
- Heslop-Harrison, J. 1971. The pollen wall: Structure and development, p. 75-98. *In* J. Heslop-Harrison (ed.). *Pollen development and physiology*. Butterworths, Londres, Inglaterra.
- Hesse, M. 1986. Orbicules and the ektexine are homologous sporopollenin concretions in Spermatophyta. *Pl. Syst. Evol.* 153: 37-48.
- Holzhueter, G., K. Narayanan & T. Gerber. 2003. Structure of silica in *Equisetum arvense*. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 512-517.
- Huysmans, S., G. EL-Ghazaly & E. Smets. 1998. Orbicules in Angiosperms: morphology, function, distribution, and relation with tapetum types. *Bot. Rev.* 64: 240-272.
- Kaufman, P.B., D.J. La Croix & P. Dayanandan. 1973. Silicification of developing internodes in the perennial scouring rush (*Equisetum hyemale* var. *affine*). *Dev. Biol.* 31: 124-135.
- Kedves, M. & Á. Párdutz. 1998. Ultrastructural study of X-ray irradiated spores of *Equisetum arvense* L. *Taiwania* 43: 215-224.
- Law, C. & C. Exley. 2011. New insight into silica deposition in horsetail (*Equisetum arvense*). *Law and Exley. BMC Plant Biology* 11: 12.
- Lehmann, H., K.M. Neidhart & G. Schlenkermann. 1984. Ultrastructural investigations on sporogenesis in *Equisetum fluviatile*. *Protoplasma* 123: 38-47.
- Lellinger, D.B. 2002. A modern multilingual glossary for taxonomic pteridology. *Pteridologia* 3: 1-263.
- Lugardon, B. 1981. Les globules des filicinées, homologues des corps d'Ubisch des spermatofytes. *Pollenet spores* 23: 94-124.
- Lugardon, B. 1990. Pteridophyte sporogenesis: a survey of spore wall ontogeny and fine structure in a polyphyletic plant group, p. 95-120. *In* S. Blackmore & R.B. Knox (eds.). *Microspores: evolution and ontogeny*. Academic, Londres, Inglaterra.
- Madjd, A. & F. Roland-Heydacker. 1978. Sécrétions et dégénérescence des cellules du tapis dans l'anthère du *Soja hispida* Moench, Papilionaceae. *Grana* 17: 167-174.
- Marengo, N.P. 1949. A study of the cytoplasmic inclusions during sporogenesis in *Onoclea sensibilis*. *Am. J. Bot.* 36: 603-613.
- Marengo, N.P. 1977. Ultrastructural features of the dividing meiocyte of *Onoclea sensibilis*. *Am. J. Bot.* 64: 600-601.
- Marengo, N.P. & M.A. Badalamente. 1978. The fine structure of the newly formed spore of *Onoclea sensibilis*. *Amer. Fern. J.* 68: 52-54.
- Moran, R.C. 1995. Equisetopsida, p. 4. *In* R. Davidse, M. Sousa & S. Knapp (eds.). *Flora Mesoamericana* 1, Psilotaceae and Salviniaceae, Instituto de Biología UNAM, Missouri Botanical Garden and the Natural History Museum, Londres, Inglaterra.
- Murillo, M.T. & M.A. Harker. 1990. Helechos y plantas afines de Colombia. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, colección Enrique Álvarez Lleras* N° 2 Bogotá, Colombia.

- Murillo, M.T.P., J. Murillo & A. León. 2008. Pteridófitos de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales-Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Biblioteca José Jerónimo Triana, no. 18. Bogotá, Colombia.
- Mursalimov, S.R. & E.V. Deineko. 2011. An ultrastructural study of cytomixis in tobacco pollen mother cells. *Protoplasma* 248: 717-724.
- Olsen, L.T. & B. Gullvåg. 1973. A fine-structural and cytochemical study of mature and germinating spores of *Equisetum arvense*. *Grana* 13: 113-118.
- Pacini, E. 1997. *Tapetum* character states: analytical keys for *tapetum* types and activities. *Can. J. Bot.* 75: 1448-1459.
- Pacini, E., G.G. Franchi & M. Hesse. 1985. The *tapetum*: its form, function, and possible phylogeny in *embryophyta*. *Pl. Syst. Evol.* 149: 155-185.
- Pacini, E. & G.G. Franchi. 1993. Role of the *tapetum* in pollen and spore dispersal. *Pl. Syst. Evol.* 7: 1-11.
- Page, C.N. 1972. An interpretation of the morphology and evolution of the cone and shoot of *Equisetum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 65: 359-397.
- Parkinson, B.M. 1987. Tapetal organization during sporogenesis in *Psilotum nudum*. *Ann. Bot.* 60: 353-360.
- Passarelli, L.M. 2007. Estudios esporales en el grupo *Blechnum penna-marina* (Blechnaceae, Pteridophyta). *Acta Bot. Malacitana* 32: 49-66.
- Passarelli, L.M., J.G. Gabriel, C. Prada & C.H. Rolleri. 2010. Spore morphology and ornamentation in the genus *Blechnum* (Blechnaceae). *Grana* 49: 243-262.
- Pryer, K.M., A.M. Smith & J.E. Skog. 1995. Phylogenetic relationship of extant ferns based on evidence from morphology and rbcL sequences. *Amer. Fern J.* 85: 205-282.
- Pryer, K.M., H. Schneider, A.R. Smith, R. Cranfill, P.G. Wolf, J.S. Hunt & S.D. Sipes. 2001. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature* 409: 618-622.
- Punt, W., P.P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson & A. Le Thomas. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 143: 1-83.
- Raghavan, V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes. Cambridge University, Londres, Inglaterra.
- Rincón, B.E.J., H.G. Forero, L.V. Gélvez, G.A. Torres & C.H. Rolleri. 2011. Ontogenia de los estróbilos, desarrollo de los esporangios y esporogénesis de *Equisetum giganteum* (Equisetaceae) en los Andes de Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 59: 1845-1858.
- Rosanoff, S. 1865. Zurkenntniss des baues und der entwicklungsgeschichte des pollens der Mimosaceae. *Jahrb. Wiss. Bot.* 4: 441-450.
- Roshchina, V., V. Yashin & A. Kononov. 2004. Autofluorescence of developing plant vegetative microspores studied by confocal microscopy and microspectrofluorimetry. *J. Fluoresc.* 14: 745-750.
- Rowley, J.R. 1962. Non homogeneous sporopollenin in microspores of *Poa annua* L. *Grana Palynol.* 3: 3-19.
- Sheffield, E. & P.R. Bell. 1979. Ultrastructural aspects of sporogenesis in a fern *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Ann. Bot.* 44: 393-405.
- Tchórzewska, D. & J. Bednara. 2011. The dynamics of the actin cytoskeleton during sporogenesis in *Psilotum nudum* L. *Protoplasma* 248: 289-298.
- Triana-Moreno, L.A. & J.A. Murillo. 2005. Helechos y plantas afines de Albán (Cundinamarca): El bosque subandino y su diversidad. Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt", Bogotá, Colombia.
- Tryon, R.M. & A.F. Tryon. 1982. Ferns and allied plants with special reference to tropical America. Springer, Nueva York, EE.UU.
- Tryon, A.F. & B. Lugardon. 1991. Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure, and diversity based on electron microscope study. Springer, Nueva York, EE.UU.
- Uehara, K. & S. Kurita. 1989. An ultrastructural study of spore wall morphogenesis in *Equisetum arvense*. *Am. J. Bot.* 76: 939-951.
- Uehara, K. & S. Murakami. 1995. Arrangement of microtubules during spore formation in *Equisetum arvense* (Equisetaceae). *Am. J. Bot.* 82: 75-80.
- Ueno, J. 1960a. On the fine structure of the cell walls of some gymnosperm pollen. *Biol. J. Nara Women's Univ.* 10: 19-25.
- Ueno, J. 1960b. Studies on pollen grains of Gymnospermae. *J. Inst. Polyt. Osaka. D.* 11: 109-136.
- Vinckier, S. & E. Smets. 2002. Morphology, ultrastructure and typology of orbicules in Loganiaceae. L. and related genera, in relation to systematics. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 119: 161-189.
- Von Ubisch, G. 1927. Zur Entwicklungsgeschichte der Antheren. *Planta* 3: 490-495.
- Wolniak, S.M. 1976. Organelle distribution and apportionment during meiosis in the microsporocyte of *Ginkgo biloba*. *Am. J. Bot.* 63: 251-258.
- Yamazaki, T. & M. Takeoka. 1962. Electron microscopic investigations of the fine details of the pollen grain surface in Japanese gymnosperms. *Grana Palynol.* 3: 3-12.
- Zajac, K. 1995. Ultrastructural features of secretory tapetum in the capsule of the moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. *Phytomorphology* 45: 31-37.

