

43  
2e



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

## **BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE *Bursera medranoana* Rzedowski & Ortiz (*Burseraceae*). UNA ESPECIE DE ORIGEN HIBRIDO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

AUREA DEL CARMEN, CORTES PALOMEC



DIRECCION DE TESIS:

DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN

DR. JUAN SERVANDO NUNEZ FARFAN

1998  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECRETARIA ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

268354



Universidad Nacional  
Autónoma de México

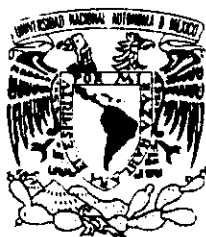


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Biología reproductiva de Bursera medranoana Rzedowski & Ortiz  
(Burseraceae). Una especie de origen híbrido.  
realizado por Aurea del Carmen Cortés Palomec

con número de cuenta 8900145-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Propietario

Dr. Juan Servando Nuñez Farfán

Propietario

M. en C. Nelly Diego Pérez

Suplente

M. en C. Silvia Espinosa Matias

Suplente

Biól. Eduardo Alberto Pérez García

Eduardo A. Pérez G.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**A LA VIDA**

**A MIS PADRES**

CELESTINO CORTÉS CERVANTES Y ELSA PALOMEC GARCÍA  
GRACIAS POR DARME LA VIDA,  
POR SU AMOR Y SU APOYO INCONDICIONAL.

CON TODO MI CARIÑO PARA TÍ **ADÁN MANUEL**  
GRACIAS POR SER MI HERMANO.

A MIS TÍAS  
EVITA Y ADEMIS  
POR SU CARIÑO.

A todos los que me ayudaron en el trabajo de campo, especialmente del laboratorio del Dr. Juan Nuñez (Judith, Eduardo, Rafael, María, Jesús) y que me hicieron sentir que en realidad las laderas de la Barranca no eran tan inclinadas.

A todo mis amigos y compañeros de generación (95-98) con los cuales conocí la Biología.

A Ernesto García Cabrera por su amor y apoyo en las etapas más importantes de mi vida.

Finalmente al proyecto PAPIT, DGAPA UNAM IN-211997 que apoyo la impresión de esta tesis.

**ÍNDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
Familia Burseraceae .....	3
Género <i>Bursera</i> .....	3
Ubicación taxonómica de <i>Bursera medranoana</i> .....	4
<i>Bursera medranoana</i> .....	5
<i>B. morelensis</i> y <i>B. schlechtendalii</i> .....	5
Reproducción asexual.....	5
Concepto de especie.....	6
Agamospermia.....	7
Especiación por hibridación.....	8
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>12</b>
Zona de estudio.....	12
Colecta del material biológico.....	12
Trabajo de laboratorio.....	13
<b>Inclusión en paraplast.....</b>	<b>13</b>
a) <i>tinción</i> .....	13
b) <i>Histoquímicas</i> .....	13

<b>Inclusión en JB4.....</b>	<b>13</b>
<i>a) tinción.....</i>	<i>13</i>
<b>Microscopía electrónica de barrido.....</b>	<b>13</b>
Trabajo de campo.....	14
<b>Monitoreo de frutos en <i>B. medranoana</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>Polinización controlada entre <i>Bursera morelensis</i></b>	
<b>y <i>Bursera medranoana</i>.....</b>	<b>14</b>
<i>DAPPI.....</i>	<i>15</i>
<i>Receptividad de estigmas de B. medranoana.....</i>	<i>15</i>
<i>Viabilidad del polen de B. morelensis.....</i>	<i>16</i>
<b>Producción de frutos en <i>Bursera morelensis</i> y <i>Bursera</i></b>	
<b>    <i>medranoana</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
Observaciones de campo.....	17
Microesporogénesis y microgametogénesis.....	18
Megaesporogénesis y megagametogénesis.....	19
Formación de embriones.....	21
Monitoreo de frutos en <i>Bursera medranoana</i> .....	21
Polinización controlada entre <i>Bursera morelensis</i>	
y <i>B. medranoana</i> .....	22
<i>DAPPI.....</i>	<i>22</i>
<i>Receptividad de estigmas de B. medranoana.....</i>	<i>22</i>
<i>Viabilidad del polen de B. morelensis.....</i>	<i>22</i>
Microscopía de barrido.....	22
Anteras de <i>B. morelensis</i> .....	23
Producción de frutos en <i>B. morelensis</i> y <i>B. medranoana</i> ....	24
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
Microesporogénesis y microgametogénesis.....	50

Megaesporogénesis y megagametogénesis.....	52
Primeras etapas del desarrollo de la semilla.....	53
<b>LITERATURA CONSULTADA.....</b>	<b>57</b>



## RESUMEN

*Bursera medranoana* Rzedowski & Ortiz (Burseraceae) es una especie de origen híbrido entre *Bursera morelensis* Ramírez y *Bursera schlechtendalii* Engl. que habita en la Barranca de Tolantongo en Hidalgo, México. *B. medranoana* posee flores perfectas, si embargo en sus anteras no se observan granos de polen; pese a esto todos los individuos poseen frutos que permanecen adheridos a la planta madre por varios meses, en ocasiones por un año.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que en *Bursera medranoana*:

a) las anteras se atrofian durante su desarrollo. La máxima etapa en la cual se observan anteras viables es el momento en el que las células madres de las microsporas entran en meiosis. La esterilidad masculina se atribuye a una disfunción tapetal y/o a la depositación de taninos en el tejido conectivo alrededor de los haces vasculares.

b) La formación del saco embrionario aparentemente es tetraspórica de tipo *Adoxa*, pero en ningún caso fue observada una ovocélula funcional. Alteraciones en su formación fueron evidentes.

c) La formación de semillas es agamospérmica. Se forman embriones a partir del tegumento interno del óvulo, es decir, *Bursera medranoana* se reproduce por apomixis.

## INTRODUCCIÓN

*Bursera medranoana* Rzedowski y Ortiz (Burseraceae) es una especie híbrida entre *Bursera schlechtendalii* Engler y *Bursera morelensis* Ramírez (Rzedowski & Ortiz, 1988). Se le encuentra creciendo en las laderas de la Barranca de Tolantongo en el estado de Hidalgo, asociada a poblaciones de sus progenitores (Hiriart, 1981). Es una especie arbórea hermafrodita que produce abundantes frutos y semillas. Éstas, al madurar, poseen un embrión que ocupa casi todo el volumen de la semilla, además de tener un pseudoarilo producto del mesocarpo que las rodea y que tiene un intenso color naranja, probablemente relacionado con la dispersión de la semilla (Rzedowski & Kruze, 1979).

Observaciones en campo de *B. medranoana* mostraron la ausencia de granos de polen en las anteras de flores en anthesis (Rzedowski & Ortiz, 1988), lo cual contrasta con la abundante producción de frutos de la especie.

Dada esta observación, el tipo de reproducción que presenta este híbrido podría ser sexual o asexual. En el primer caso, podría ser que las anteras produjeran escasos granos de polen que pasaran desapercibidos en observaciones macroscópicas, y que fueran éstos los responsables de la fecundación, o que uno o ambos progenitores fueran los donadores del polen.

Por otro lado, si la especie presentara una reproducción asexual, no necesitaría de granos de polen para producir semillas con embriones. Su formación podría deberse a un proceso apomíctico.

En este trabajo se exploraron estas dos hipótesis para poder dar respuestas, del tipo de reproducción que presenta *B. medranoana*.

## ANTECEDENTES

### Familia Burseraceae

La familia Burseraceae está formada por aproximadamente 540 especies de plantas leñosas que se distribuyen en 18 géneros, encontrándose en *Bursera*, *Canarium*, *Commiphora* y *Protium* alrededor de 385 especies. Su distribución es tropical, habitan selvas caducifolias y húmedas, principalmente en América, África y Asia, ya que en Australia son pocas las especies encontradas. Son plantas perennes arbustivas o arborescentes, cuya corteza puede o no ser exfoliante, y que producen aceites esenciales aromáticos.

En Asia y África, algunas especies son maderables, pero su principal uso es en la industria de los perfumes al extraer sus esencias.

La importancia etnobotánica de la familia Burseraceae en México está relacionada con la quema de sus resinas en ceremonias religiosas y en su uso para la elaboración de barnices y pegamentos para porcelana y marfil, adicionalmente se le atribuyen algunas propiedades medicinales contra las picaduras de animales venenosos y contra enfermedades venéreas, recolectándose esta resina entre los meses de septiembre y octubre principalmente (Martínez, 1959).

### Género *Bursera*

El género *Bursera* destaca al contar con aproximadamente 100 especies distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta Perú y el sur de Brasil, las Antillas y las islas Galápagos y Revillagigedo (Rzedowski y Kruze, 1979); de estas especies, 80 se encuentran en México en selvas caducifolias, en regiones cálidas con sequías largas e incluso se presentan en algunas regiones templadas, cálido húmedas o áridas, en altitudes entre los 600 y 1000 ms.n.m., alcanzando sus máximas concentraciones en la depresión del Balsas. El género *Bursera* se divide en dos secciones: Sección *Bullokcia* y sección *Bursera* (Rzedowski y Kruze, 1979).

Algunas especies, o al menos parte de sus poblaciones suelen ser perfectamente dioicas, mientras que en otras, individuos "masculinos" portan una pequeña proporción de flores femeninas y en otras especies, además de flores unisexuales, parecen existir con mayor o menor frecuencia las perfectas funcionales (Rzedowski & Kruze, 1979)

El primer ejemplar de *Bursera* colectado fue colocado dentro de la familia Anacardiaceae, con la cual está íntimamente relacionada y de la que se diferencia por la presencia de dos óvulos por lóculo en Burseraceae y uno en Anacardiaceae (Johri, 1984; Forman *et al.*, 1988). Otra familia con la cual se encuentra muy relacionada es Simaroubaceae, con quien comparte una gran cantidad de caracteres embriológicos (Rao, 1970).

La formación de híbridos interespecíficos es común en el género *Bursera*. Este fenómeno fue propuesto por McVaugh y Rzedowski (1965) entre especies de la misma sección, basándose en la presencia de individuos con características morfológicas intermedias. Posteriormente y gracias al empleo de técnicas cromatográficas ha sido posible hacer análisis comparativos entre los terpenoides presentes en los aceites esenciales de *Bursera*, permitiendo la resolución de algunos problemas taxonómicos del género (Rzedowski y Ortiz, 1982).

En la Barranca de Tolantongo en Hidalgo, México, conviven entre otras, cuatro especies del género *Bursera* que son de particular interés para este estudio: *Bursera* aff. *simaruba* (L.) Sarg., *B. morelensis* Ramírez, *B. Schlechtendalii* Engl. y *B. medranoana*, ésta última propuesta como una especie de origen híbrido entre las dos primeras por Rzedowski y Ortiz (1988).

#### Ubicación taxonómica de *B. medranoana*.

La ubicación taxonómica de *Bursera medranoana* es la siguiente (Cronquist, 1981; Rzedowski & Kruze, 1979).

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales

Familia	Burseraceae
Género	<i>Bursera</i>
Sección	<i>Bursera</i>
Especie	<i>Bursera medranoana</i>

### *Bursera medranoana*.

Por lo general la presencia de híbridos en *Bursera* se relaciona con zonas de alta perturbación lo que conlleva a la existencia de números poblacionales bajos (Rzedowski y Kruze, 1979), *B. medranoana*, sin embargo, forma una población que en algunas laderas de la Barranca de Tolantongo iguala en número a la de *B. morelensis* y supera a la *B. schlechtendalii*. Rzedowski y Ortiz (1988), mencionan que la población de *B. medranoana* está ajena a la perturbación, es vigorosa y reproductivamente bien aislada y activa.

Todos los individuos de *B. medranoana* presentan frutos, aunque en algunas ocasiones en poca cantidad. Las flores son perfectas y aunque presentan estambres no se observan granos de polen en ellos (Rzedowski y Ortiz, 1988).

### *B. morelensis* y *B. schlechtendalii*.

En cuanto a las especies progenitoras, éstas son dioicas y pertenecen a la sección *Bursera* del género (Toledo, 1982). En *Bursera morelensis* las flores masculinas y las femeninas son (3-4)5-meras, mientras que en *B. schlechtendalii* las masculinas son 4-5-meras y las femeninas son trímeras, a veces ambos tipos en un individuo (Toledo, 1982).

### Reproducción asexual

La reproducción es el requisito para perpetuar a la población o a la especie a través del tiempo, siendo el medio de multiplicación y colonización de nuevos territorios (Grant, 1989).

Dentro de la reproducción se tienen los procesos sexuales que implican una alternancia de fecundación y meiosis que provocan recombinación genética y los procesos asexuales que constituyen una ventaja en un ambiente poco

cambiante, al cual la especie ya está bien adaptada, dado que con este mecanismo se evita o se reduce al mínimo la formación de tipos recombinados mal adaptados, y muy probablemente el sistema completo de reproducción de una especie que ha tenido éxito durante un periodo largo de tiempo represente una combinación de procesos sexuales y asexuales (Grant, 1989).

### Concepto de especie

La especie biológica se define como un conjunto de formas que se entrecruzan real o potencialmente, en donde el entrecruzamiento entre especies está limitado por mecanismos de aislamiento (Ridley, 1996). Sin embargo, este concepto de especie biológica sólo se puede aplicar a organismos biparentales, ya que los uniparentales no forman grupos que se aparean, por esto Grant (1989) emplea el término microespecie para designar a las poblaciones de grupos vegetales predominantemente uniparentales, uniformes por si mismas y ligeramente diferenciadas entre sí en cuanto a la morfología, en ocasiones con una distribución restringida a una cierta área geográfica y con frecuencia de origen híbrido.

Este mismo autor agrupa a las microespecies en cuatro clases principales, según su modo de reproducción: a) microespecies clonales: que se reproducen asexualmente por propagación vegetativa, como *Opuntia sp.*; b) microespecies agamospermas, que se reproducen por agamospermia (producción asexual de semillas) como es el caso de *Rubus moriferus*; c) microespecies heterógamas, que se reproducen siguiendo los patrones genéticos de *Oenothera biennis* o *Rosa canina* y d) microespecies autógamas como *Erophila sp.* que se reproduce sexualmente. De estas clases, las microespecies heterógamas y agamospérmicas son híbridos heterocigotos permanentes.

Al principio, la población híbrida puede constar sólo de algunos individuos, posteriormente pueden existir clones pequeños y microespecies endémicas hasta formar por último microespecies extensas.

## Agamospermia.

Como se mencionó, con el término agamospermia se refiere a la producción de semillas viables con embriones que se han producido sin fecundación. Dentro de la agamospermia Grant (1989) reconoce tres tipos:

a) La partenogénesis, en el cual la semilla se forma a partir de una ovocélula no reducida en el saco embrionario, b) La apogamia, en la cual la semilla se forma a partir de alguna célula o núcleo distinto de la ovocélula en el saco embrionario, y c) La embrionía adventicia, en la cual la semilla proviene de alguna célula somática en el óvulo.

Para Bhojwani (1981), las plantas apomícticas son aquellas que han substituido la reproducción sexual que incluía meiosis y singamia por una reproducción asexual en la cual se evita la recombinación, siendo posible encontrar en algunas ocasiones individuos de una misma especie se reproducen sexual y apomícticamente. Este autor, reconoce dos grandes grupos de apomixis: la reproducción vegetativa y la agamospermia. Dentro de la agamospermia, Bhojwani (1981) y Howell (1998) ubican a la embrionía adventicia, la diplosporia (que sería el término equivalente a la partenogénesis de Grant), y la aposporia en la cual el embrión se forma directamente de un saco embrionario no reducido proveniente de la nucela.

La agamospermia puede ocurrir sin polinización o en ocasiones requerirla denominándose entonces pseudogamia (Grant, 1989), y puede ser facultativa u obligada, existiendo en el primer caso una producción sexual de semillas, mientras que en la segunda todas las semillas producidas son asexuales (Raghavan, 1997).

Por otra parte, para Asker y Jerling (1992) los términos apomixis y agamospermia son sinónimos, para Bhojwani (1974) la agamospermia es un tipo de apomixis. En este trabajo se tomarán los términos agamospermia y apomixis como sinónimos.

## Especiación por hibridación

En el proceso de especiación por hibridación en plantas se tienen dos grandes tipos. A) Especiación por hibridación con reproducción sexual, en donde el origen de una nueva especie biológica ocurre directamente de un híbrido interespecífico. B) La especiación por hibridación se da con reproducción asexual y la multiplicación del híbrido es por mecanismos que evitan el ciclo sexual, la diseminación de este tipo de híbridos es a través de un área geográfica definida, de modo que alcanza el tamaño y composición de una microespecie o especie uniparental. Dentro de este último tipo encontramos el caso en el cual la especiación sucede por apomixis; una nueva microespecie clonal o agamospérmica se desarrolla, a partir de un híbrido interespecífico por medio de propagación vegetativa o por formación de semilla agamospérmica respectivamente (Grant, 1989).

La hibridación natural y el flujo génico pueden tener lugar entre especies biológicas, siempre y cuando las barreras al cruzamiento tengan una eficacia menor al 100%, las barreras al cruzamiento entre especies vegetales relacionadas del mismo género o sección pueden con frecuencia romperse hasta cierto punto, por lo que no es raro encontrar dos especies simpátricas distintas, y que no se aparean, distribuidas a través de una amplia zona pero que se hibridizan localmente en uno o en pocos sitios (Grant, 1989), siendo la hibridación un proceso que se da de manera natural con relativa frecuencia (Ridley, 1996).

Sólo en aquellos casos en los que en los que la sexualidad y el cruzamiento persisten a través de las etapas formativas críticas se puede hablar del origen híbrido de nuevas especies biológicas. Sin duda muchos híbridos se forman en la naturaleza, pero sólo algunos logran convertirse en nuevas especies, ya que la esterilidad y la segregación son dos factores que deben tenerse en cuenta al tratar la especiación por hibridación, sobre todo la segregación (Ridley, 1996; Grant, 1989).



## JUSTIFICACIÓN

México contiene una gran diversidad de especies de la familia Burseraceae y es propuesto como un centro de especiación para el género *Bursera*, siendo el fenómeno de hibridación uno de los procesos a los cuales se atribuye esta diversidad. Como se mencionó, *B. medranoana* es una especie de origen híbrido entre *B. morelensis* y *B. schlechtendalii* (Rzedowski & Ortiz, 1988) por lo que conocer cómo es la reproducción de esta especie permitirá hacer inferencias sobre la reproducción de otros híbridos en el género.

Por otro lado, los trabajos embriológicos para la familia han sido pocos y son muy antiguos e incompletos, y se carece de éstos para las especies mexicanas (Nagendran, C & S. Dinesh, 1989; D'Arcy & Keating, 1996). Los más importantes son los de Narayana (1960a y b) donde hace una recopilación de la información embriológica existente en la familia hasta esa época, el de Srivastava (1968) y Rao (1970). Las únicas especies del género *Bursera* que han sido estudiadas son: *B. serrata* Colebr. (Narayana, 1960b) y *B. delpechiana* Poiss (Srivastava, 1968).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando como un hecho que *Bursera medranoana* es un híbrido entre *B. morelensis* y *B. schlechtendalii* (Rzedowski & Ortiz, 1988) y que, según observaciones macroscópicas, no produce granos de polen, surge el problema de cómo se reproduce esta especie. Para abordar dicho problema se plantean dos hipótesis: A.- que *B. medranoana* se reproduce mediante un proceso apomíctico o B.- que uno o ambos progenitores (*B. morelensis* y *B. schlechtendalii*) estén involucrados en el aporte de granos de polen para que se efectúe una reproducción sexual.

En la presente investigación, se plantean las siguientes preguntas:

- 1.-¿No se producen efectivamente granos de polen viables en los microsporangios de *B. medranoana*, como lo sugieren las observaciones macroscópicas?
- 2.-Si no hay formación de granos de polen, ¿qué parte del proceso (microesporogénesis o microgametogénesis) está alterado en *Bursera medranoana*?
- 3.-¿Sigue el desarrollo del gineceo un patrón normal formándose óvulos y megagametofitos con ovocélulas morfológicamente viables?
- 4.- Suponiendo que *B. medranoana* se reproduce sexualmente, ¿es (son) alguno o ambos progenitores el (los) donador (es) de polen?. En este trabajo solo se explora a *B. Morelensis* como donador de polen.
- 5- ¿Habrá indicios que nos sugieran la presencia de algún tipo de reproducción asexual para la especie?

Para responder estas preguntas se plantearon los siguientes objetivos:

## OBJETIVOS

### General

Determinar algunos aspectos de la biología reproductiva de *B. medranoana* que permitan discernir entre una reproducción sexual o asexual en este híbrido.

### Particulares

- ❖ Realizar estudios estructurales del desarrollo de óvulo y antera en *Bursera medranoana*.
- ❖ Caracterizar a los granos de polen de *B. morelensis*, *B. schlechtendalii* y *B. medranoana* (si los hubiera) con microscopía electrónica de barrido (MEB).
- ❖ Realizar polinizaciones controladas en el campo entre *B. medranoana* y *Bursera morelensis* para establecer si los granos de polen de ésta última participan en la fecundación de los óvulos de la primera.
- ❖ Hacer un monitoreo de semillas en individuos de *B. medranoana* durante un año para establecer sus tiempos de maduración así como otros aspectos relacionados con su reproducción.

## METODOLOGÍA

### Zona de estudio

La Barranca de Tolantongo, forma parte de los cañones excavados por los afluentes del Río Pánuco en la Sierra Madre Oriental. Esta zona corresponde a la zona árida Hidalguense que comprende los estados de Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México y norte de Puebla, esta zona se divide en valles intermontanos de sotavento y barrancas profundas de algunos afluentes del Pánuco (Hiriart, 1981).

La flora de la Barranca de Tolantongo, se encuentra relacionada con la de la cuenca del Balsas, con parte de la vegetación de la zona árida tamaulipeca, con la flora de la zona árida poblana, con el chaparral de California, con la flora de la Sierra Madre Oriental e incluso con la flora Neotropical. Las laderas se caracterizan por presentar distintos tipos de matorral xerófilo (Hiriart, 1981), pero en la parte inferior, cerca del fondo, sobre todo en áreas de exposición sur o protegidas, existen manchones de bosques de *Bursera morelensis* (Rzedowski & Ortiz, 1988).

### Colecta del material biológico

Para abordar el problema reproductivo de *Bursera medranoana* desde el punto de vista embriológico, se realizaron colectas por tres años (1996, 1997 y 1998) de botones florales, flores en antesis y frutos distintas etapas de desarrollo que se fijaron en FAA (formol, ácido acético, etanol al 96% y agua, 1:0.5:5:3.5) y Glutaraldehído-Paraformaldehído (Curtis, 1986). También se fijaron anteras maduras de *B. schlechtendalii* y *B. morelensis*.

## Trabajo de laboratorio

### **Inclusión en paraplast**

El material fijado en FAA se lavó y deshidrató en alcoholes graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%, 100% durante 3 horas en cada uno), se infiltró con paraplast-xilol (1:1) paraplast-xilol (2:1) y paraplast puro a 56°C durante 24 horas; los cortes se obtuvieron mediante el uso de un microtomo de rotación a 7 y 8 micrómetros de grosor. Johansen (1940).

#### *Tinción*

Los cortes fueron desparafinados y teñidos con safranina-verde rápido en metilselolve siguiendo la técnica de López *et al.* (1998).

#### *Histoquímicas*

En algunos cortes se aplicaron las técnicas de vainillina (López-Curto *et al.*, 1998) y permanganato de potasio ( $K_2MnO_4$  al 2%) (Jensen, 1962), las cuales evidencian la presencia de taninos.

### **Inclusión en JB4**

El material fijado con Glutaraldehído-Paraformaldehído se procesó para su inclusión en JB4 (Valley, 1976).

Se deshidrató en acetonas graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%, 100%), se infiltró con la mezcla de componente A y catalizador por 3 horas a temperatura ambiente e incluyó en la mezcla de componente A, catalizador y componente B. Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio a 2 y 3 micrómetros de grosor.

#### *Tinción*

Los cortes, se tiñeron con azul de toluidina (Locquin y Langeron 1985).

### **Microscopía de barrido**

Se evaluó si de manera natural es posible que se dé la polinización entre las especies progenitoras y *B. medranoana*, para esto fue necesario identificar a los granos de polen al microscopio electrónico de barrido para establecer diferencias entre ellos. Lo anterior permitiría, en caso de encontrar granos de

polen al analizar los estigmas de *B. medranoana* al MEB, determinar de qué progenitor provienen.

Flores masculinas de *B. morelensis* y *B. schlechtendalii* fueron colectadas y procesadas para su observación al MEB. Según la metodología de Kessel y Shih (1976).

Este material se deshidrató con alcoholes graduales: 30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100% durante 3 horas en cada uno y posteriormente se sumergieron en acetona pura durante 30 minutos.

Las muestras se llevaron a punto crítico de CO<sub>2</sub> y se montaron en los portamuestras metálicos cubriéndose con una fina capa de oro, se observaron y tomaron placas fotográficas.

Los granos de polen de *B. morelensis* deshidratados, se montaron directamente en los portamuestras metálicos siguiendo el resto de la metodología antes citada.

### Trabajo de campo

Al mismo tiempo que se procesaba el material biológico colectado, se realizó el trabajo de campo que complementaría la parte embriológica.

#### **Monitoreo de frutos en *Bursera medranoana***

Dado el antecedente de la permanencia de frutos adheridos a la planta madre en *B. medranoana* por varios meses. Se realizó un monitoreo de frutos en cinco individuos, realizándose tres visitas a la población (mayo 8, diciembre 15, 1997 y abril 20, 1998) para saber por cuánto tiempo permanecen adheridos al árbol.

#### **Polinización controlada**

Bajo el supuesto de una reproducción sexual en *B. medranoana* donde estuviera involucrado el polen de uno o ambos progenitores (y no el propio), se realizó una polinización controlada a mediados de junio de 1998 entre *B.*

*morelensis* como donador de polen y *B. medranoana* como receptor. Esto no fue posible hacerlo con *B. schlechtendalii* debido a que las laderas donde se distribuyen sus individuos son un poco inaccesibles como para realizar un trabajo de campo exhaustivo en ellas.

Se seleccionaron al azar 10 individuos de *B. medranoana*, en los cuales se cubrieron con bolsas de tul flores en pre-antésis, las cuales al abrir fueron usadas para polinizarlas manualmente con polen de *B. morelensis*. Posteriormente, el material fue colectado después de 5, 7, 18, 20 y 24 horas de la polinización. Estas flores fueron fijadas en FAA e incluidas en Paraplast siguiendo la técnica antes mencionada y usando el colorante DAPPI y microscopía de fluorescencia para su análisis.

#### *Prueba de DAPPI*

Con esta prueba se evidencia la presencia de los núcleos del tubo polínico al ser un colorante para DNA.

Los cortes fueron desparafinados e hidratados gradualmente (100%, 96%, 85%, 70%, 50%, 30%, agua destilada). Para su observación se colocó una gota de DAPPI a una concentración de 20 $\mu$ M sobre el corte y fue excitado con una lámpara de luz ultravioleta y un filtro con una emisión de 440 a 470nm.

Al realizar una polinización controlada se deben de reducir al mínimo las variables, por lo que se evaluó la receptividad del estigma de *B. medranoana* al igual que la viabilidad y la cantidad de granos de polen de *B. morelensis* para asegurar que estos factores no alterarían los resultados.

#### *Receptividad de estigma en B. medranoana*

La receptividad de los estigmas de *Bursera medranoana* se evaluó al sumergirlos en una solución de agua oxigenada al 3%. La presencia de efervescencia indica receptividad (Dieringer et al, 1994).

### *Viabilidad de los granos de polen de B. morelensis*

La viabilidad de los granos de polen se evaluó mediante la tinción de Alexander (Dafni, 1992).

Sobre la antera macerada en un portaobjetos se añadió 1 gota de ácido láctico y posteriormente 2 gotas de la tinción de Alexander, la preparación se pasó sobre una flama por un par de segundos y se dejó enfriar para su posterior observación al microscopio óptico. El citoplasma del grano de polen se tiñe en rojo y la pared celular en verde. La viabilidad se mide evaluando la proporción de granos de polen teñidos en rojo que son los que se consideran viables.

### **Producción de frutos en *B. morelensis* y *B. medranoana***

Considerando que se involucrara un proceso asexual en la reproducción de *B. morelensis* y *B. medranoana*, en el mes de abril de 1998 se seleccionaron al azar 20 individuos de cada una de estas especies. En cada árbol, una rama con un cierto número de yemas fue embolsada con redes de tul, y otra rama solamente fue marcada tomándose nota del número de yemas florales que poseía, esto con el objeto de que la presencia o ausencia de frutos formados posterior a las lluvias, nos brindara información sobre su origen. Los resultados de este tratamiento fueron tomados en una visita realizada en Julio de 1998.



## RESULTADOS

### Observaciones de campo

En la Barranca de Tolantongo, Hidalgo, la población de *B. medranoana* es grande comparada con la de *B. schlechtendalii* a la cual supera en número, y similar a la de *B. morelensis*. Es difícil observar individuos de *B. medranoana* y *B. schlechtendalii* creciendo en la misma ladera; sin embargo, esto es muy común entre *B. morelensis* y *B. medranoana*.

Tanto en las especies progenitoras como en el híbrido, en los meses de abril y mayo es posible observar yemas en los ápices de las ramas, sin embargo, la producción de flores y de hojas no se da sino hasta después del inicio de las primeras lluvias. Las flores de estas especies producen una gran cantidad de néctar y se han observado visitantes florales como abejas y avispas en *B. morelensis* y *B. medranoana*.

Las flores de *Bursera medranoana* son perfectas, poseen tres pétalos, tres sépalos y seis anteras atróficas (estaminodios) que rodean al gineceo (fig. 2 y 5). Este último, tiene tres estigmas papilosos y un estilo. El ovario es tricarpelar, trilocular y posee dos óvulos por lóculo (fig 21). El estilo presenta tres canales resiníferos que recorren toda su longitud (fig. 6) y rodean al ovario, en el centro se encuentra el tejido de transmisión cuyas células se distinguen fácilmente del resto de las células estilares y papilas estigmáticas por su tamaño poco más grande que el resto y por sus citoplasmas que se muestran con gran actividad (fig. 7).

Es evidente la presencia de nectarios florales (fig. 5), así como una gran cantidad de taninos en las células del ovario, pétalos y estambres.

A simple vista los estambres de *B. medranoana* parecen normales; sin embargo, al macerarlos es evidente la ausencia de granos de polen, mientras que al seguir el mismo procedimiento con las anteras de *B. morelensis*, la cantidad de granos de polen que se observan es muy grande.

## Microesporogénesis y Microgametogénesis

Durante la ontogenia, el androceo es el primer verticilo sexual en formarse, y posteriormente surge el gineceo (fig. 14).

En etapas tempranas del desarrollo floral se observan los primordios de las anteras rodeados por una epidermis monoestratificada bajo la cual se encuentra la capa parietal primaria y las células del tejido esporógeno. La capa parietal primaria se divide periclinalmente dando lugar a dos capas, la parietal secundaria externa y la parietal secundaria interna (fig. 8). Cada una de estas capas a su vez se divide periclinalmente formando las capas de la pared de la antera: el endotecio, una capa media biestratificada y el tapete cuyas células son binucleadas (fig. 8). El desarrollo de la pared de la antera corresponde al tipo básico.

Mientras se forma la pared de la antera, las células del tejido esporógeno se dividen mitóticamente e incrementan en tamaño para dar lugar a las células madres de las microsporas (fig. 9). Estas células tienen núcleos muy conspicuos, en donde se aprecia cierta organización de la cromatina que corresponde al inicio de la meiosis. En esta etapa es posible observar en ciertas zonas de la pared de la antera, que las capas medias se dividen periclinalmente para formar más de un estrato celular cada una (fig. 9).

En una etapa posterior del desarrollo, las células madres de las microsporas sufren una gran vacuolización, posteriormente se colapsan, el citoplasma flocula y se puede ver densamente teñido (fig. 10). La meiosis no se lleva a cabo y por lo tanto no se observan tétradas de microsporas. En flores en anthesis, las anteras están colapsadas y los lóculos que deberían ocupar los granos de polen obliterados, en algunos existen en su interior escasas células semejantes a las células madres de las microsporas.

La pared de la antera sufre alteraciones debidas principalmente a la degeneración de sus capas, principalmente del tapete, el cual se vacuoliza poco a poco hasta que finalmente sus células se colapsan y se observan vacías en una flor en anthesis (fig. 11). Se debe mencionar que en ningún momento del desarrollo se observó un tapete bien conformado, por el contrario su desarrollo fue anormal.

En anteras maduras, las células del endotecio no presentan engrosamientos en sus paredes (figs. 11 y 12).

Después de revisar macroscópicamente las anteras de mas de 500 flores nunca se observaron granos de polen (fig. 11 y 12).

Además durante el desarrollo de la antera, en el tejido conectivo se observa una depositación gradual de taninos en vacuolas que poco a poco unen (fig. 13) hasta que llenan completamente a la célula (fig. 12). Este depósito se inicia en etapas muy tempranas del desarrollo cuando aún se está formando la pared de la antera y las células madres de las microsporas se ven morfológicamente normales. En una antera madura el depósito de taninos ha llegado a su máximo. Es importante hacer notar que los haces vasculares que llegan a la antera quedan rodeados por los taninos (fig.11).

### Megaesporogénesis y megagametogénesis

Los primordios carpelares aparecen al tiempo en que en las anteras están presentes las células madres de las microsporas (fig. 14 y 15).

En el gineceo se desarrolla el primordio nucelar (fig. 16), en una etapa posterior se observa como surge el tegumento interno y empieza a rodear a la nucela (fig. 17). Al mismo tiempo que se diferencia la célula madre de la megaspora, los dos tegumentos aparecen rodeando a la nucela constituyéndose así un óvulo bitégmico en el cual el micropilo está formado por el tegumento interno (fig. 19). La célula madre de la megaspora ocupa una posición profunda en la nucela debido a la multiplicación masiva de las células parietales formando así un óvulo crasinucelado (fig. 18, 19 y 20).

La célula madre de la megaspora presenta características inusuales como la presencia de una gran vacuola (fig. 20).

El óvulo crece y se curva para formar un óvulo anátropo pendulado, con el micropilo orientado hacia el estilo. De los seis óvulos que se forman solo uno se transforma en la semilla, cinco abortan en etapas tempranas del desarrollo.

El proceso que da inicio a la fase gametofítica del ciclo o sea la meiosis, nunca se observó y por lo tanto tampoco la tétrada de megasporas. En su lugar,

se observaron organizaciones celulares que se apartan de los patrones descritos hasta ahora para el desarrollo normal del gametofito femenino en angiospermas. Hecha esta salvedad, se tratará de dar una interpretación de lo que podría estar sucediendo: (figs. 22-31).

Al parecer, la célula madre de la megaspora sufre meiosis formando un sincicio en el cual se observan primero dos núcleos (fig.22) y posteriormente cuatro núcleos haploides (fig. 23). No se forman paredes ni sucesivas ni simultáneas.

Al parecer los cuatro núcleos resultado de la meiosis son funcionales y se involucran en la formación del saco embrionario. Posteriormente hay formación de paredes para formar cuatro megasporas. Cada núcleo de megaspora se divide mitóticamente y se forman así, los ocho núcleos del saco embrionario (fig. 24 y 25) los cuales se encuentran en el extremo micropliar agrupados en pares (dos núcleos por citoplasma). En una etapa posterior se observa la migración de estas células en el saco embrionario (fig. 26 y 27), si esto fuera cierto el desarrollo de saco de embrionario correspondería al tipo *Adoxa* (Bhojwani, 1974).

En ningún caso se observó un saco embrionario bien formado que nos indicara la presencia de una ovocélula funcional (gametofito femenino) o de núcleos polares en una célula central. Lo que se observa son arreglos celulares como los que se muestran en las figuras 28 a 31. Las cuales se interpretan, pero la ausencia de una ovocélula nos impide asegurar que dicha interpretación sea correcta.

De la gran cantidad de ovarios procesados, lo que se ha logrado observar son arreglos celulares completamente atípicos que podrían interpretarse de distintas maneras. En cualquier caso la imposibilidad de obtener un saco embrionario que se asemeje a alguna de las múltiples formas reportadas para la enorme variación de los gametofitos femeninos en angiospermas, podría indicar una mal formación en el sistema reproductor femenino de *Bursera medranoana* al igual que lo descrito para el androceo.

### Formación de embriones

En algunos óvulos, a partir de las células tegumentarias se pudo observar la formación de proembriones somáticos de 2, 4 y hasta 6 células, cuyo origen los sitúa dentro de la categoría de embriones adventicios (fig. 32-41).

En la figura 32 se tiene un corte longitudinal de un fruto en sus primeras etapas de formación, donde se ubica dentro de un lóculo al óvulo. La figura 33 es un acercamiento del óvulo donde destaca la coloración de las células más externas del tegumento debido a la presencia de taninos. La figura 39 muestra la división de una célula somática del tegumento, mientras que en la 40 se ve un proembrión lineal de cuatro células, en la figura 41 éstos embriones incrementan su número y es posible ver claramente a los embriones somáticos desarrollándose. En todas las fotografías el extremo micropilar está orientado hacia la parte superior de la hoja. Las figuras 34 a 38 muestran diferentes acercamientos de las células embrionarias.

### Monitoreo de frutos en *Bursera medranoana*

Durante el año en el que se hizo el seguimiento de los frutos en la población de *Bursera medranoana*, se observó que los frutos permanecen en el árbol por doce meses, es decir las semillas que se encuentran expuestas en la época de floración en un año dado provienen de las flores que estuvieron expuestas un año antes. El desarrollo de los frutos es bastante rápido y aproximadamente dos meses después de la floración los frutos se muestran morfológicamente maduros; sin embargo, al abrirlos en su interior se observa una semilla vacía a simple vista y no es sino hasta después de varios meses cuando las semillas pueden ser observadas con un embrión en su interior.

Un fenómeno que está relacionado con la madurez de la semilla es la coloración del pseudoarilo, el cual va de amarillo verdoso en las primeras etapas hasta anaranjado - rojizo en la semilla madura. Este pseudoarilo es de naturaleza

lipídica, formado por una gran cantidad de gotas de aceite (lo cual se observa fácilmente al hacer una preparación temporal).

Solo cuando la semilla está madura, el fruto se abre y permite que la semilla quede expuesta, la cual destaca debido a su intensa coloración anaranjada producto del mesocarpo del fruto (Rzedowski y Kruze, 1979) (fig. 3).

### Polinización controlada entre *B. morelensis* y *B. medranoana*

Bajo el supuesto de una reproducción sexual en *B. medranoana* involucrando a *B. morelensis* como donador de polen se obtuvo lo siguiente:

#### DAPPI

Esta prueba no funcionó. Se pudieron observar granos de polen de *B. morelensis* sobre el estigma de *B. medranoana*, aunque no tubos polínicos.

#### Viabilidad del polen de *B. morelensis*

*Bursera morelensis*, produce polen en grandes cantidades aprox. 50,000 granos de polen por flor. La viabilidad de los granos de polen observada con la tinción de Alexander fue de 97.3%.

#### Receptividad de estigma de *B. medranoana*

La receptividad del estigma de *B. medranoana* fue positiva, produciéndose una efervescencia visible a simple vista.

#### Microscopía electrónica de barrido

Al microscopio de barrido fueron evidentes diferencias en cuanto a la ornamentación de la exina entre el polen de *B. morelensis* y el de *B. schlechtendalii*, que completan la información brindada por Palacios (1984).

#### *Bursera schlechtendalii*

En microscopía de luz, el polen es triporado, aspidado, tectado y esferoidal de 25.6 (26.8) 28.8  $\mu$  x 24 (25.6) 27.2 $\mu$ . Vista polar circular, con diámetro de 25.4 (27) 28 $\mu$ . Exina de 3 $\mu$  de grosor, con la ectexina de igual espesor que la endexina, engrosada a la altura de los poros hasta 4 $\mu$  con la superficie estriada-reticular. Poros: endoaperturas transversalmente elípticas con diámetro de 3 (4.2) 5.6 x 2.4 (2.8) 3.2 $\mu$  (Palacios, 1984).

Los granos de polen de *Bursera schlechtendalii* fueron observados al MEB. Figs. 45 (vista polar) y fig. 46 (vista ecuatorial). Destaca su ornamentación estriada (Moore *et al.*, 1991).

#### *Bursera morelensis*

Al microscopio de luz, el polen de *B. morelensis* es tricolporado, subprolato esferoidal, de 30 (33.2) 36 $\mu$  x 28 (31.4) 34 $\mu$ . Vista polar circular, con diámetro de 30 (32.8) 36 $\mu$ . Exina de 2 $\mu$  de grosor, con la ectexina de igual espesor que la endexina, engrosada a la altura de los poros hasta 4 $\mu$  con la superficie estriada-reticular. Poros: endoaberturas transversalmente elípticas con diámetros de 7.5 x 5 $\mu$ . Colpos: ectoaberturas mal definidas y difusas de  $\pm 10$  a 12  $\mu$  de largo (Palacios, 1984). Su ornamentación es foveolada (Moore *et al.*, 1991) (fig. 44, vista ecuatorial).

Las diferencias morfológicas de los granos de polen entre las dos especies, permitirían conocer la procedencia de los mismos en caso de ser encontrados en el estigma de *B. medranoana*, lo cual no sucedió al analizar estigmas de flores en anthesis de *B. medranoana* colectadas durante la época de floración.

En ningún caso se observaron granos de polen en el estigma de *B. medranoana* (fig. 5).

#### Anteras de *B. morelensis*

Se procesaron anteras maduras de *B. morelensis* en paraplast para evaluar como era la depositación de taninos en su tejido de transmisión. Se observó, en cortes longitudinales de antera madura que la pared consta de dos capas: la epidermis y el endotecio en el cual se aprecian engrosamientos en sus paredes (fig. 43). Es evidente también la presencia de taninos en las células del tejido conectivo aunque en menor proporción que en *B. medranoana* y nunca en concentraciones tales que las llenen completamente (fig. 42).

### Producción de frutos

Las tablas I y II, muestran como fue la producción de frutos en 20 individuos de *Bursera morelensis* y 20 de *B. medranoana* que fueron muestreados para evaluar la producción de semillas en ausencia de polinización.

Se muestra una columna con el número de yemas presentes en las ramas a muestrear por árbol (con y sin bolsa) y al final un promedio de éstas. En otra columna se muestra el número de frutos producidos o de flores secas encontradas dentro de las bolsas.



FIG. 1: *Bursera medranoana* creciendo sobre una ladera de la Barranca de Tolantongo, Hidalgo.

FIG. 2: Flor en antesis de *B. medranoana*. Se han retirado pétalos y sépalos para observar los verticilos reproductores.

FIG. 3: Semilla expuesta en un individuo de *Bursera medranoana*.

FIG. 4: Semillas en distintos estados de maduración, donde se observa el cambio en la coloración del pseudoarilo.

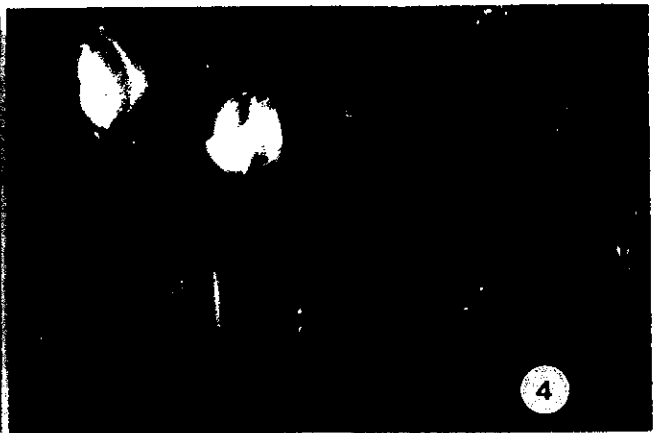
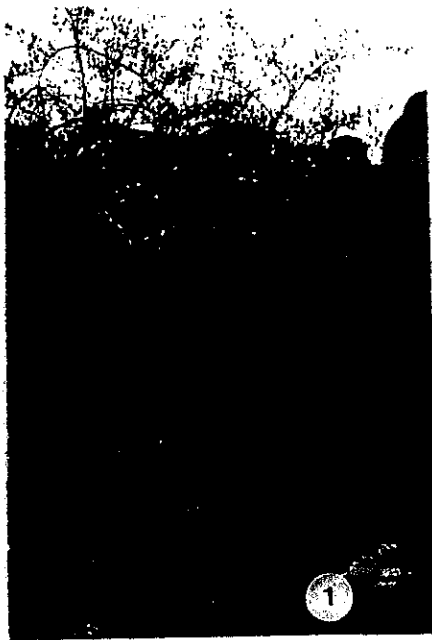
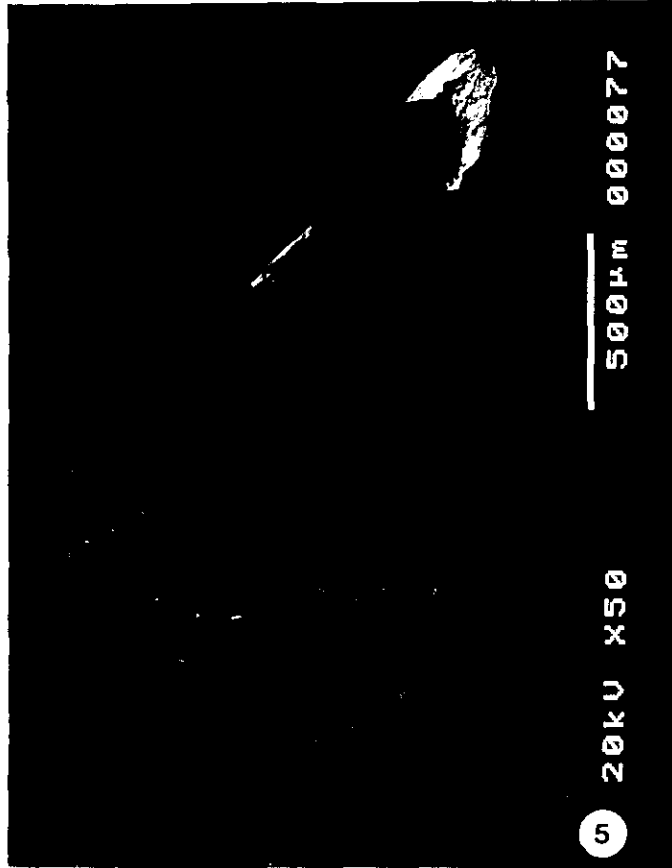


FIG. 5: Flor en antesis de *Bursera medranoana* vista al MEB. Se han retirado pétalos y sépalos.

N: nectarios.



- FIG. 6: Corte transversal del estilo, donde se aprecian tres canales resiníferos rodeando al tejido de transmisión. Escala=67 $\mu$ m.
- FIG. 7: Corte transversal de estilo. Se observa el tejido de transmisión. Escala=34 $\mu$ m.
- FIG. 8: Corte longitudinal de antera en un botón floral de *Bursera medranoana* donde se aprecia la división de las células de la pared de la antera. Escala=86 $\mu$ m.
- FIG. 9: Corte longitudinal de antera donde destacan las células madres de las microsporas entrando en meiosis. Escala=71 $\mu$ m.
- FIG.10: Corte longitudinal de antera. células madres de las microsporas colapsadas, citoplasmas densamente teñidos. Escala=36 $\mu$ m.
- FIG. 11: Antera madura de *Bursera medranoana* en corte transversal donde destaca la depositación de taninos en el tejido conectivo rodeando al haz vascular. Escala=52 $\mu$ m.
- FIG.12: Antera madura de *Bursera medranoana* en corte transversal. Escala=67 $\mu$ m.

C: canal resinífero.

CM: células madres de las microsporas.

E: epidermis.

HV: Haz vascular.

i: capa parietal secundaria interna.

M: capas medias.

N : endotecio.

T: Tejido de transmisión.

Ta: tapete.

U: Tejido conectivo.

x: capa parietal secundaria externa.

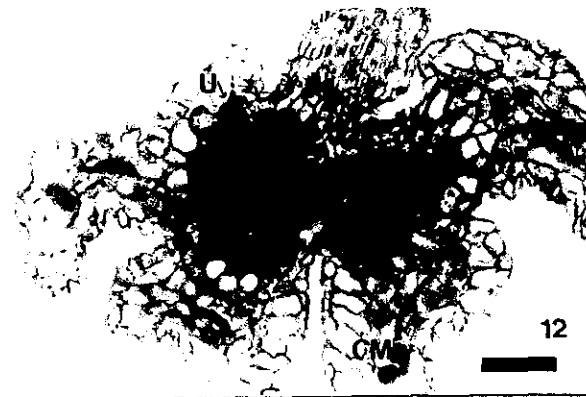
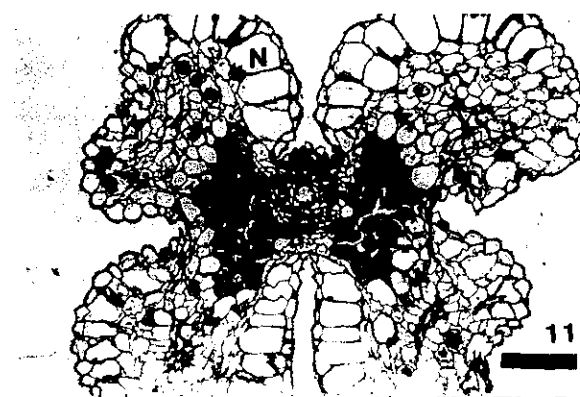
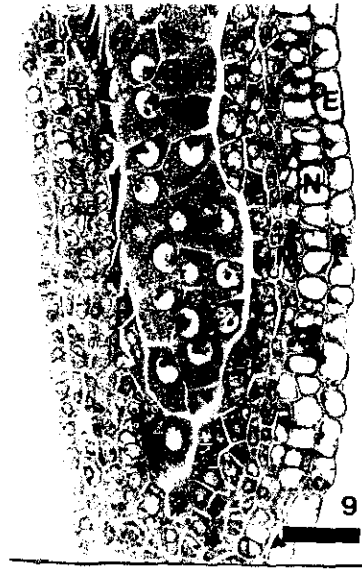
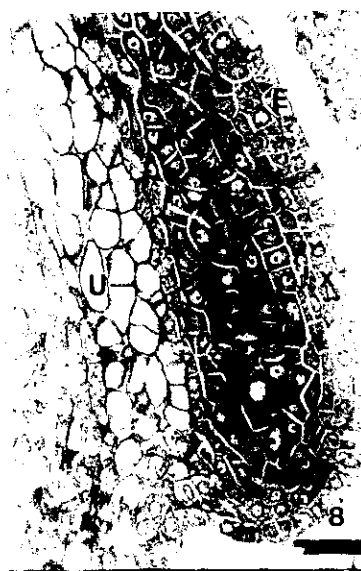
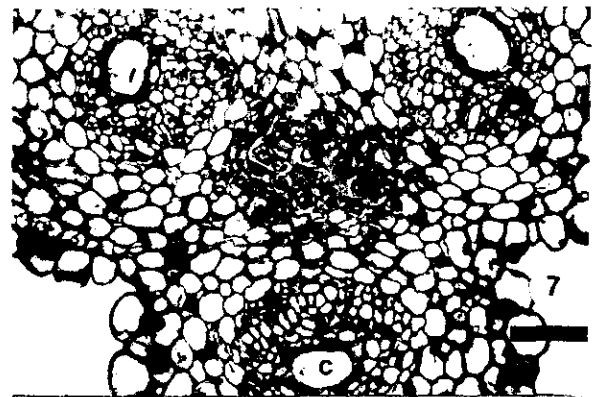
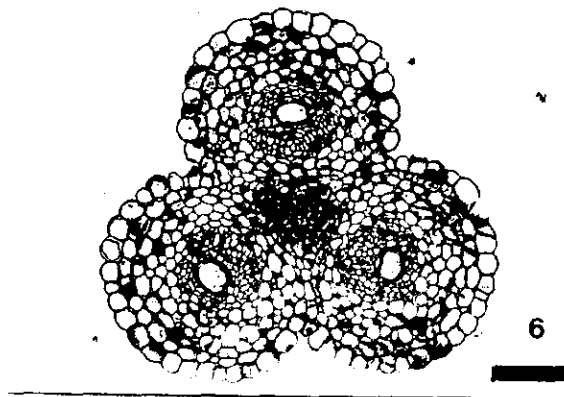


FIG. 13: Corte transversal de antera. Acercamiento al tejido conectivo mostrando la depositación gradual de taninos por vacuolización en sus células. Escala=34µm.

FIG. 14: Corte longitudinal de botón floral donde se ven los primordios carpelares y las anteras. Escala=61µm.

FIG. 15: Acercamiento del primordio de ovario. Escala=35µm.

FIG. 16: Corte longitudinal de ovario donde se observa el primordio nucelar en un lóculo del ovario. Escala=38µm.

FIG. 17: Nucela con un primordio de tegumento. Escala=42µm.

FIG. 18: Corte longitudinal de ovario mostrando un óvulo crasinucelado, bitégmico. Escala=35µm.

C: carpelos.

CM: células madres de las microsporas.

CP: capa parietal.

l:lóculo.

Ne: nucela.

O: Ovario

TE: tegumento externo.

TI: tegumento interno.

U: Tejido Conectivo

V: vacuolas.

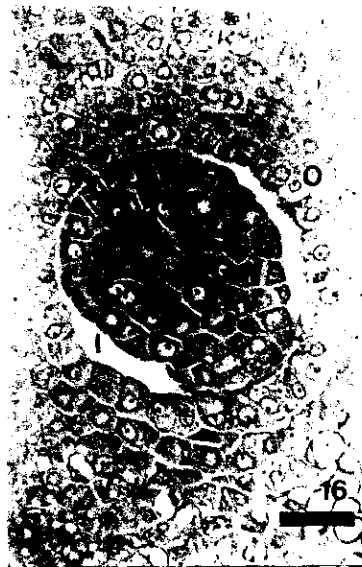
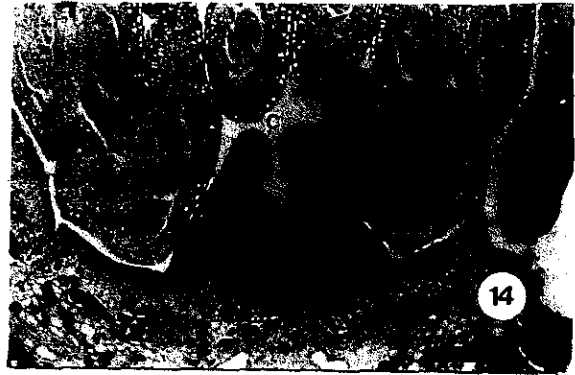




FIG. 19: Corte longitudinal de óvulo con célula madre de la megaspora.  
Escala=36 $\mu$ m.

FIG. 20: célula madre de la megaspora en la nucela destacando su vacuola.  
Escala=15 $\mu$ m.

FIG. 21: Corte longitudinal de ovario. Lóculo con dos óvulos en su interior.  
Escala=86 $\mu$ m.

FIG. 22: Corte longitudinal de óvulo mostrando un citoplasma con dos núcleos en el tejido nucelar. Escala=44 $\mu$ m.

FIG. 23: Corte longitudinal de óvulo. En el tejido nucelar se ve un sincicio celular con 4 núcleos en su interior. Escala=41 $\mu$ m.

FIG. 24 y 25: Células binucleadas en el extremo micropilar dentro de la nucela. Escala=87 $\mu$ m.

CMe: Célula Madre de la Megaspora

i: micropilo

l: lóculo

N : nucela

Nu: núcleos

O: Ovario

T: tegumento

TE: tegumento externo

TI: tegumento interno

V: vacuola

Nota: el extremo micropilar está orientado hacia la parte superior de la figura.



- FIG. 26: Corte longitudinal de óvulo mostrando células en el interior de la nucela. Se aprecia el micropilo y el hipostase. Escala=79 $\mu$ m.
- FIG. 27: Células que probablemente formarán el saco embrionario dentro del tejido nucelar. Escala=70 $\mu$ m.
- FIG. 28: Corte longitudinal de óvulo. Se aprecian una antípoda y una sinérgida en la nucela. Escala=84 $\mu$ m.
- FIG. 29: Corte longitudinal de óvulo. Dentro del tejido nucelar se ve el "aparato del huevo" en el extremo micropilar. Escala=75 $\mu$ m.
- FIG. 30: Corte longitudinal de óvulo con una antípoda en el extremo calazal. Escala=34 $\mu$ m.
- FIG. 31: Corte longitudinal de óvulo. Células conspicuas en la nucela. Escala=40 $\mu$ m.

A: aparato del huevo

An: antípoda

Ce: células

H: Hipostase

i: Micropilo

l: lóculo

Ne: Nucela

Nu: Núcleos

O: Ovario

SE: Saco embrionario

Si: sinérgida

T: Tegumeto

T: Tegumentos



FIG. 32: Corte longitudinal de fruto en donde se observa un lóculo con un óvulo en su interior. Escala=473 $\mu$ m.

FIG. 33: Acercamiento de semilla joven. Escala=73 $\mu$ m.

FIG. 34 a 38: Acercamientos de las células que forman parte de los embriones somáticos. Destaca el tamaño de estas células con respecto a las que lo rodean. 34 Escala=75 $\mu$ m., 35 Escala=13 $\mu$ m., 36 Escala=32 $\mu$ m., 37 Escala=10 $\mu$ m., 38 Escala=50 $\mu$ m.

E: Embrión

H: Hipostase

I: Lóculo

N : Nucela

O: Ovario (fruto)

T: Tegumentos

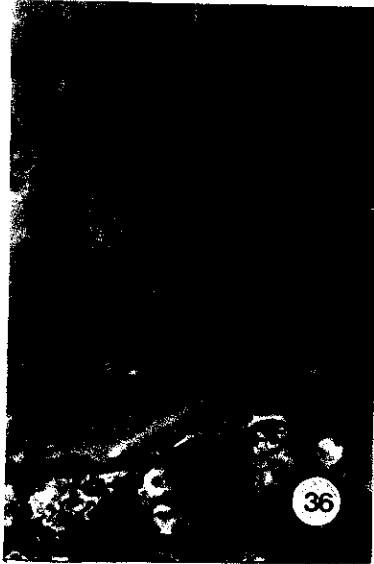


FIG. 39: Primera etapa de división de una célula tegumentaria que formará un embrión somático. Escala=50 $\mu$ m.

FIG. 40: Proembrión lineal en el extremo micropliar de los tegumentos. Escala=45 $\mu$ m.

FIG. 41: Embriones somáticos. Escala=54 $\mu$ m.

E: Embrión

En: Nucela

PE: Proembrión





FIG.42: Corte longitudinal de antera de *Bursera morelensis*. Escala=131 $\mu$ m.

FIG. 43: Engrosamientos fibrosos del endotecio de *Bursera morelensis*.  
Escala=72 $\mu$ m.

FIG. 44: Vista ecuatorial de un grano de polen de *Bursera morelensis*  
(MEB).

En: endotecio

P: polen

T: tejido conectivo

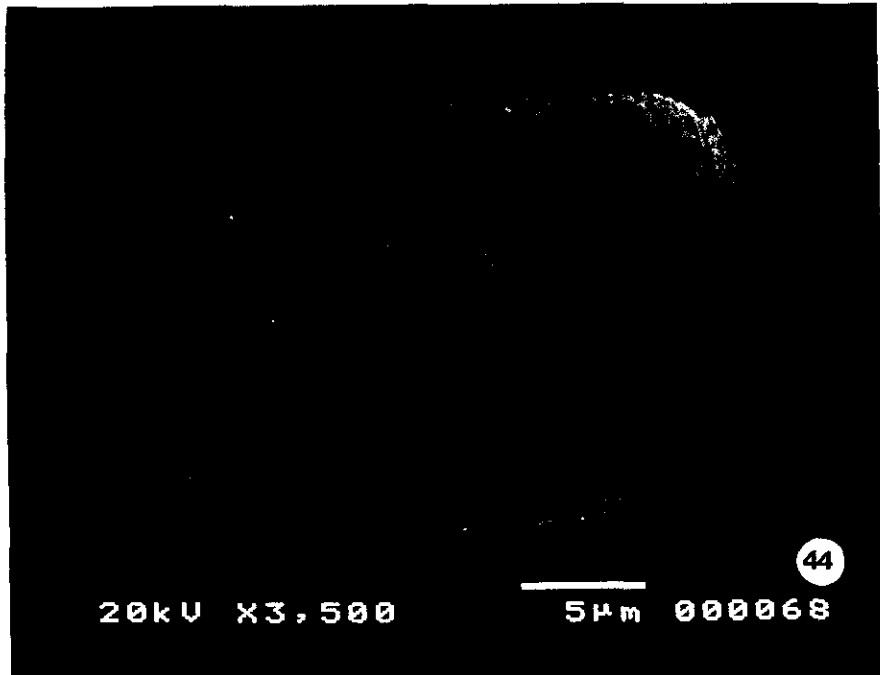
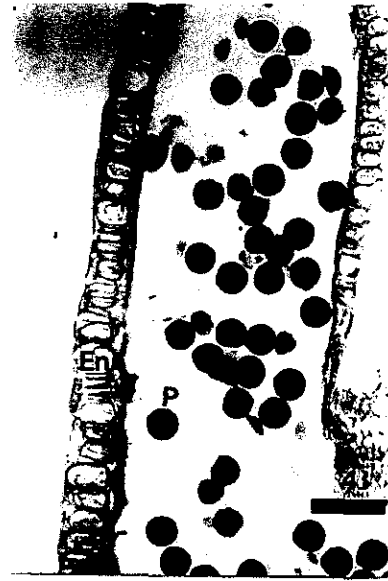


FIG. 45: vista polar de un grano de polen de *B. schlechtendalii* al MEB.

FIG. 46. vista ecuatorial de un grano de polen de *B. Schlechtendalii* al MEB.



20kV X3,500

5µm 000069

45

20kV X3,500

5µm 000070

46

Tabla I producción de frutos en *Bursera morelensis*

20 de abril de 1998

21 de julio de 1998

(antes de las lluvias)

(después de las lluvias)

Individuo	Rama con Bolsa	Rama sin bolsa	Rama con Bolsa		Rama sin bolsa	
	Número de yemas	Número de yemas	Frutos	Flores	Frutos	Flores
A	5	7	**	8	**	**
B	4	7	**	8	23	**
C	3	4	**	12	21	**
D	3	6	**	**	2	**
E	4	7	**	**	**	**
F	5	8	**	3	23	**
G	3	7	**	5	16	4
H	4	5	**	7	**	1
Y	3	4	**	10	**	**
J	2	5	**	**	16	**
K	3	3	**	4	3	1
L	4	4	**	12	12	**
M	2	3	**	**	9	**
N	3	9	**	4	8	**
Ñ	3	3	**	1	32	1
O	2	3	**	**	11	2
P	2	3	**	4	4	1
Q	2	7	**	12	24	1
Promedio	3.3	5.2				

Tabla II. Producción de frutos en *Bursera medranoana*

Individuo	20 de abril de 1998 (antes de las lluvias)		21 de julio de 1998 (después de las lluvias)			
	Con Bolsa Número de yemas	Rama sin bolsa Número de yemas	Frutos	Flores	Frutos	Flores
34	5	5	**	8	**	**
35	5	5	**	8	**	**
35	6	7	**	3	**	**
37	9	5	**	10	**	**
38	6	8	**	3	**	**
6	4	8	**	10	**	1
7	6	6	**	5	**	**
8	5	5	**	12	**	6
9	5	5	**	10	**	3
10	5	6	1	8	1	3
11	4	7	**	18	**	1
13	4	6	**	13	**	3
13	5	7	**	11	**	6
14	4	6	**	12	**	1
15	7	8	**	12	**	6
16	6	9	**	14	**	4
17	6	6	**	11	**	1
18	7	6	**	5	**	3
19	5	8	**	19	**	7
20	7	7	**	13	**	2
promedio	5.55	6.5				

Nota: Los números de los individuos muestreados corresponden a los números que tienen los individuos en el campo.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las observaciones en el campo revelaron que las flores de *B. medranoana* y *B. morelensis* son visitadas por abejas y avispas, lo cual está muy probablemente relacionado con la gran cantidad de néctar que producen y que es evidente a simple vista en flores recién abiertas. Estas observaciones se refuerzan con la gran cantidad de nectarios que se presentan en el receptáculo de la flor. Al tener una polinización entomófila (Palacios, 1984; Rzedowski & Kruze, 1979) y dada la aparente similitud en tamaño y coloración de las flores entre estas especies) así como las observaciones realizadas en el campo del comportamiento de sus posibles polinizadores, que al parecer son los mismos en ambas especies, sería válido pensar que exista una cierta depositación de granos de polen de *B. morelensis* y *B. schlechtendalii* sobre los estigmas de *B. medranoana*, aunque dado un crecimiento diferencial de estas especies en las laderas de la barranca no fue posible observar el comportamiento de los visitantes florales en *B. schlechtendalii*.

Las diferencias encontradas al MEB de los granos de polen de *B. morelensis* y *B. schlechtendalii*, permitieron hacer una búsqueda sistemática de los granos de polen en el estigma de *B. medranoana*. De haberlos encontrado hubiera sido sencillo identificar la especie que estaba funcionando como donadora de polen; sin embargo, nunca se observaron sobre ningún estigma.

En la descripción de los granos de polen de *Bursera* realizada por Palacios (1984) menciona que tanto *B. morelensis* como *B. schlechtendalii* tienen una ornamentación estriada reticular, que el de *B. schlechtendalii* es triporado y aspidado, mientras que el de *B. morelensis* es tricolporado y aspidado. En su estudio concluye que los granos de polen del género son muy uniformes a tal grado que resulta imposible elaborar una clave para separar a la mayor parte de sus especies. Este autor termina diciendo que posteriores observaciones al

microscopio de barrido eran necesarias para poder detectar mayores diferencias entre ellos. En el presente estudio se vió que al MEB hay diferencias en forma y en ornamentación entre los granos de polen de las dos especies. Se considera que un estudio sistemático del polen del género *Bursera* al MEB probablemente constituiría una buena herramienta para separar a las especies del género de acuerdo a lo que indican los resultados de este trabajo.

Observaciones en el campo por un año e indagaciones bibliográficas (Rzedowski y Kruze 1979) sugerían que los frutos de *Bursera* permanecen adheridos al árbol por varios meses. Una observación de los frutos a lo largo de un año comprobó que en *B. medranoana* los frutos permanecen adheridos a la planta madre por varios meses (11 comprobados). En *B. morelensis* Rzedowski & Kruze (1979) han descrito este fenómeno, y además advierten que en un momento dado sólo pueden observarse unos cuantos frutos en estado de madurez. Los resultados en *B. medranoana* muestran un comportamiento similar, ya que las semillas que se colectaron y que aún estaban cubiertas por el fruto tenían una coloración amarillenta de su pseudoarilo y al romper la semilla, ésta aparentemente está vacía, lo cual contrasta con hecho de que las semillas maduras presentan una coloración rojiza del pseudoarilo y en su interior existe un embrión formado. No fue posible observar semillas expuestas durante nuestro muestreo, no obstante, desde la visita realizada en diciembre se observó que el número de frutos se había reducido en un 80%, lo cual implica que quizá estas pérdidas corresponden a las semillas que maduraron y que fueron dispersadas o a semillas que se perdieron por alguna otra causa como herbivoría ya que se han observado frutos que parecen estar "picados" por algún insecto y que no se desarrollan. La presencia de los frutos en el árbol por varios meses, así como el hecho de que los frutos inmaduros posean en su interior semillas aparentemente vacías podría explicarse debido a una lenta formación del embrión y del endospermo, lo cual ha sido reportado en *Bursera delpechiana* Poiss, en donde se ha observado que el núcleo primario del endospermo permanece sin dividirse por un periodo de tiempo considerable (Srivastava, 1968).



De los resultados obtenidos de la polinización controlada, cabe destacar el hecho de que en una de las flores que sirvió como testigo se produjo una semilla. Esto sugiere una formación apomíctica, sin embargo no hay explicación para el resto.

La viabilidad de los granos de polen de *B. morelensis* fue evaluada y si consideramos que por flor se producen aproximadamente 50,000 granos de polen y que cada individuo produce cientos de flores, la cantidad de granos de polen que produce la especie es muy grande, sin embargo en ningún caso se observaron granos de polen de *B. morelensis* sobre los estigmas de *B. medranoana*.

En el material polinizado manualmente se observaron estructuras similares a tubos polínicos en algunos cortes de ovario, lo cual podría interpretarse como una compatibilidad entre los granos de polen de *B. morelensis* y el estigma de *B. medranoana*. Desgraciadamente el que la técnica de DAPPI no haya funcionado impide asegurar esto. La ausencia de reactividad del DAPPI con el tejido vegetal probablemente se debió a que las muestras fueron fijadas en una mezcla de formol, ácido acético y etanol, fijador conocido como FAA. Esta observación se repitió con otro material biológico distinto y también se obtuvo una respuesta negativa. Es claro que alguna(s) de las sustancias que constituyen a este fijador o la mezcla de ellas influyen negativamente en la reacción e impiden que los núcleos celulares fluorescan.

En la Tabla I se observa que en las ramas embolsadas, no polinizadas, de *B. morelensis*, no se produjeron frutos pero es evidente la presencia de flores secas en anthesis, así mismo se pudo observar el crecimiento de hojas dentro de las bolsas lo cual nos indica que las bolsas no fueron un impedimento en el desarrollo de las flores; en el caso de las ramas no embolsadas encontramos que todos los individuos presentan frutos. Los resultados de esta tabla, nos hablan de que al ser las flores polinizadas por insectos, probablemente abejas y avispas, se evitó que éstos las visitaran y que de esta manera se diera la polinización.

En el caso de *B. medranoana* (Tabla II), la ausencia de frutos en ambos tratamientos es desconcertante ya que se esperaba la presencia de frutos,

independientemente de que estuviera involucrado un proceso apomíctico o uno sexual en su reproducción. Para explicar esto se recurrió a las observaciones de campo, las cuales revelaron que la producción de frutos fue escasa en toda la población de *B. medranoana*, probablemente debido a las condiciones de sequía que caracterizaron a 1998. Al estar conviviendo en la misma ladera las poblaciones de *B. morelensis* y *B. medranoana*, si esta fuera la causa se esperaría observar un fenómeno similar en *B. morelensis* lo cual no ocurrió. Sin embargo, recordando la naturaleza híbrida de esta especie, se puede pensar que los requerimientos de agua son diferentes a los de sus progenitores. En 1997 año en el cual las lluvias se adelantaron y fueron abundantes se observó una producción muy alta de frutos en *B. medranoana*, lo cual sugiere que las necesidades hídricas de la especie son elevadas. Sin embargo esta observación requiere de una investigación a fondo para poder establecer si es el caso.

En mayo de 1997, fue posible observar frutos en todos los estadios de desarrollo en un mismo individuo, desde frutos que empezaban su desarrollo y en los cuales aun se observaban restos de algunos verticilos florales (pétalos, sépalos e incluso estilo) hasta semillas maduras que estaban expuestas y que destacaban gracias al color anaranjado-rojizo de su pseudoarilo. Con los resultados obtenidos del seguimiento de los frutos durante un año, sabemos que estos frutos que estaban expuestos en 1997 provenían de las flores que estuvieron en antesis en 1996.

#### Microesporogénesis y microgametogénesis:

El desarrollo de la pared de la antera es aparentemente normal, siguiendo un patrón de desarrollo de tipo básico (Bhojwani, 1981); no obstante, hay ciertas irregularidades. El hecho de que el endotecio no posea engrosamientos en sus paredes conlleva a suponer que la dehiscencia no se presenta, ya que la naturaleza higroscópica de la alfa-celulosa principal componente de estos engrosamientos ayudan a la dehiscencia de las anteras en la madurez (Bhojwani, 1981).

Por otro lado las células del tapete, que son de suma importancia para el desarrollo adecuado de los granos de polen presentan una estructura celular completamente atípica. Esta capa es la encargada de nutrir a las células madres de las microsporas, de secretar la calosa (que es el principal constituyente de la pared celular de estas células), así como de secretar la calasa que es la enzima encargada de disolver esta pared después de la meiosis. El tapete además está encargado además de producir sustancias de reconocimiento para los granos de polen entre otras muchas funciones (Barnes & Blackmore, 1992), por lo que las alteraciones en su formación nos hablan de que posiblemente esté involucrado en la ausencia de los granos de polen y por lo tanto de la esterilidad masculina de la especie (Bhojwani, 1981).

El tapete que ha sido reportado en la familia Burseraceae es de tipo secretor (Rao, 1970; Narayana, 1960a y b; Srivastava, 1968), en el cual las células tapetales se mantienen funcionales durante casi todo el desarrollo de los granos de polen (Bhojwani, 1981; Barnes & Blackmore, 1992).

En el caso de *B. medranoana* el tapete es binucleado, carácter que comparte con *Bursera serrata* Roxb. (Narayana, 1960a). Un tapete uninuclear ha sido descrito para *Bursera delpechiana* (Srivastava, 1968).

Los nutrientes que llegan a la antera, provienen de los haces vasculares que corren en el centro del tejido conectivo, de donde pasan por difusión a todas las células. En *B. medranoana* la depositación gradual de taninos ocurre en el tejido conectivo alrededor de los haces vasculares y llega a su máximo en una flor en antesis, estos taninos al ser de naturaleza hidrofóbica muy probablemente estén impidiendo el paso de nutrientes a las células de la antera, y por ello éstas degeneran, ya que en una antera madura no se observan citoplasmas en ninguna de las capas que la conforman.

En el caso de *Bursera morelensis*, al observar sus anteras maduras en cortes longitudinales se detectó la presencia de taninos en el tejido conectivo; sin embargo, en ningún caso en las mismas cantidades que en *B. medranoana* y nunca obliterando a las células. Lo anterior sugiere que el depósito nunca fue tan grande como para impedir el paso de nutrientes. Además cabe destacar la

presencia de engrosamientos en las paredes del endotecio de *B. morelensis*, lo que indica su participación en la dehiscencia de las anteras.

No podemos descartar sin embargo la posibilidad de que las células madres de las microsporas no sufran una adecuada meiosis por algún problema en su sistema genético resultado de su origen híbrido (Grant, 1989; Ridley, 1996), aunque esta posibilidad no fue explorada. Estudios posteriores tal vez den respuesta a esta interrogante. En cualquier caso, ya sea que estén involucrados ambos factores, sólo uno de ellos o quizá otros más, el resultado final es la ausencia de granos de polen en la especie. Otros casos de esterilidad masculina han sido reportados en la familia, aunque las causas no se explican. Así por ejemplo, Narayana (1960b) indica que hay una tendencia a la unisexualidad en *Bursera serrata* al abortarse la parte masculina, pero en esta especie existen engrosamientos en las células del endotecio. Rao (1968) al hacer una recopilación de la información embriológica para la familia Burseraceae menciona la degeneración de las anteras en *Balsamodendron mukul* y *Santiria rubiginosa*.

### Megaesporogénesis y megagametogénesis

El óvulo en *B. medranoana* es bitégmico y crasinucelado como en *Bursera serrata* (Narayana, 1960), mientras que en *B. delpechiana* pese a que Srivastava, (1968) menciona que se trata de un óvulo crasinucelado, por la descripción que hace sobre las capas que sufren divisiones periclinales, bajo la definición de Bhojwani (1981) corresponde a un óvulo pseudocrasinucelado.

El surgimiento de la nucela, la formación de los tegumentos, la curvatura del óvulo, son procesos que se llevan a cabo normalmente, sin embargo, la presencia de una gran vacuola en la célula madre de la megaspora es una característica inusual, no observada antes en otras células madres de la megasporas viables (Dra. Márquez Guzmán Com. Pers.). Esta característica nos puede estar indicando un patrón anormal en el desarrollo del futuro saco embrionario.

Es importante destacar que la etapa de célula madre (2n) es la última etapa funcional observada tanto en la antera como en el ovario.

El tipo de desarrollo de saco embrionario reportado para la familia es monospórico de tipo *Polygonum* (Rao, 1970). La célula madre de la megaspora al sufrir meiosis forma una tétrada linear de la cual la megaspora funcional es la que se encuentra en el extremo calazal (Srivastava, 1968). Sin embargo en *Bursera medranoana*, lo más parecido a un desarrollo de saco embrionario que se encontró recuerda un saco embrionario tetraspórico de tipo *Adoxa* (Bhojwani, 1981). Al respecto, Rao (1968) menciona que en *Balsamodendron mukul* se presentan sacos embrionarios nomo, bi, tri y tetraspóricos.

La gran cantidad de material procesado y la imposibilidad de encontrar un saco embrionario bien formado del tipo que fuese, parece apoyar la idea de que no existe una megasporogénesis y megagametogénesis normal.

La ausencia de un gametofito femenino con un gameto femenino al cual poder fecundar nos indica lo innecesario de la germinación de granos de polen sobre el estigma de *B. medranoana* y la consiguiente formación de tubos polínicos, aunque en este caso habría que considerar el si su presencia es necesaria para la formación del endospermo (Howell, 1998).

### Primeras etapas del desarrollo de la semilla

El descubrimiento de la reproducción asexual en *Bursera medranoana* por embrionía somática demuestra la utilidad que tiene la embriología para entender los procesos reproductivos de una especie, ya que un análisis genético de la población, probablemente revelaría que los individuos son genéticamente iguales; sin embargo, sólo podría establecer que la especie se reproduce asexualmente, pero no indicar que tipo de proceso asexual es el que se está presentando.

Una semilla madura en su interior contiene un embrión, pero es frecuente observar durante la ontogenia de la semilla, una poliembrionía somática como la descrita en *Citrus* y otras familias como Buxaceae, Cactaceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae y Orchidaceae (Bhojwani, 1981). Los embriones formados somáticamente provienen de células del tegumento interno, por lo cual según la nomenclatura usada por Grant (1989) corresponde a una reproducción

Uno de los principales problemas que tienen los híbridos al establecerse es la competencia por los recursos con sus propios progenitores (Ridley, 1996), en este sentido *B. medranoana*, parece haber tenido éxito, ya que la población es grande comparada con la de sus progenitores. Como se mencionó, sobrepasa numéricamente a la de *B. schlechtendalii* e iguala a la de *B. morelensis* (Rzedowski & Ortiz, 1988)

La presencia de una reproducción por embrionía somática y no de una partenogénesis o una aposporia, se puede explicar por el hecho de que la embrionía adventicia es un fenómeno presente en las angiospermas principalmente en plantas tropicales y subtropicales (Grant, 1989).

La reproducción asexual al no involucrar una recombinación genética produce organismos que son genéticamente iguales; sin embargo, una reproducción agamospérmica tiene la ventaja de estabilizar el hibridismo y de ser una forma de escape a la esterilidad, ya que de otra manera no se podrían reproducir (Grant, 1989), a menos que sus números cromosómicos se vieran alterados (Ridley, 1996). La reproducción asexual, tiene la ventaja, sobre la propagación vegetativa, de conservar a la semilla como modo de dispersión lo cual tiene ventajas ecológicas importantes (Bhojwani, 1981). La reproducción implica un gasto importante para la planta, en el caso de *Bursera medranoana* este gasto podría parecer inútil al formarse estambres que no tienen ninguna función aparente y al invertirse en la formación de un gineceo, pero si comparamos la gran cantidad de frutos que se han logrado observar en algunos individuos no puede pensarse como un gasto inútil.

De cualquier forma, las restricciones que implica una reproducción agamospérmica son a largo plazo, ya que en el futuro inmediato, mientras las condiciones ambientales sean poco cambiantes la población quizá no sufra alteraciones, esto contrasta con las ventajas a largo plazo que se tienen con la reproducción sexual al generarse una variabilidad genética sobre la cual puede actuar la selección natural. Si la especie agamospérmica es muy eficiente y agresiva en el hábitat probablemente desplazará a las especies sexuales que ahí se encuentren provocando incluso su extinción o desaparición en la zona. Esto

cuestiona si realmente es desventajosa la reproducción apomíctica, ya que a largo plazo, ninguna especie tiene asegurada su existencia por mucha variabilidad que posea, la flora que se reproduce sexualmente también se extingue. En el caso de *B. medranoana* no se sabe el momento geológico en el cual apareció, pero en este momento es una especie exitosa en la Barranca de Tolantongo, por lo que su reproducción asexual le permite conservar las características que son favorecidas en su habitat.

En cuanto a la evolución que puede tener una especie agamospérmica creo que una frase que resume la idea que deseo expresar es la mencionada por Darlington (1939) y tomada de Grant (1989): la apomixis es un escape de la esterilidad, pero es un escape hacia un callejón sin salida evolutiva.

## LITERATURA CONSULTADA

- ❖ Asker, S. & L. Jerling. 1992. *Apomixis in plants*. CRC Press, E.U: 298p.
- ❖ Bhojwani, S. & P. Bhatnagar. 1981. *The Embryology of Angiosperms*. Vikas publishing house, Nueva Delhi, India. 280p.
- ❖ Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia Univeristy press, New York, E.U. 1262p.
- ❖ Curtis, P.J. 1986. *Microtecnia Vegetal*. Trillas, México. 106p.
- ❖ Dafni, A. 1992. *Pollination Ecology, a practical approach*. Oxford Univ. Press. E.U. 250p.
- ❖ D'Arcy & R. Keating. 1996. *The Anther, Form, Function and Phylogeny*. Cambridge University Press. Reino Unido. 351p.
- ❖ Dieringer, G. Y L. Cabrera. 1994. *A manual for the study of pollination ecology at field stations*. Instituto de Ecología y Alimentos, UAT. México.39p.
- ❖ Forman, L., Brandham, E., Harley, M & J. Lawrence. 1988. *Beiselia mexicana (Burseraceae) and its Affinities*. Kew Bulletin 44 (1): 1-31.
- ❖ Grant, V. 1989. *Especiación Vegetal*. Noriega, México. 589p.
- ❖ Hiriart Valencia, P. 1981. *Vegetación y fitogeografía de la Barranca de Tolantongo, Hidalgo, México*. Tesis. Facultad de Ciencias (Biología), Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 98p.
- ❖ Howell,H. 1998. *Molecular Genetics of Plant Development*. Cambridge University Press. E.U.365p.
- ❖ Jensen, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry: Principles and Practice*. W.H. Freeman and Co., San Francisco,E.U.
- ❖ Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. MacGraw-Hill, New York. 523p.
- ❖ Johri, B.M. 1984. *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Alemania. 830p.
- ❖ Kessel, R. & C. Shih. 1976. *Scanning Electron Microscopy in Biology*. Springer Verlag. Berlin, Alemania. 19p.



- ❖ Srivastava G.N. 1968. Male and female gametophytes and development of the seeds in *Bursera delpechiana* Poiss *J. Indian bot. Soc.* 47. 53-59.
- ❖ Toledo, C. 1982. El género *Bursera* (Burseraceae) en el estado de Guerrero (México). *Tesis*. Facultad de Ciencias (Biología), Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 182p.
- ❖ Valley, P. 1976. *JB4 Embedding kit*. Polysciences Inc. E.U.
- ❖ (1) <http://www.cgiar.org/CIMMYT/Biotechnology/apomixis/Newsletter/9/ANL9-8.htm>
- ❖ (2) <http://www.rrz.uni-hamburg.de/biologie/ialb/amp2/back.htm>