

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

CACTÁCEAS COLUMNARES DE MÉXICO:
ESTUDIO EMBRIOLÓGICO COMPARATIVO DE
CINCO ESPECIES DE LA TRIBU PACHYCEREEAE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)

PRESENTA

CITLALI YURIRIA NÚÑEZ MARIEL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

MÉXICO, D. F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de posgrado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haber financiado esta investigación a través del proyecto 3666P-N.

A la Dra. Judith Márquez por haber dirigido esta tesis. Al Dr. Mark Engleman por enseñarme a valorar un área de la biología que pareciera estar a punto de extinguirse. Al Dr. Héctor Hernández por sus sugerencias en el desarrollo del trabajo de investigación. Al Dr. José Luis Villaseñor por su contribución a mi formación académica, por su asesoría en la elaboración del manuscrito y por su generosidad para compartir sus conocimientos y su tiempo. Al Dr. Alejandro Casas por las observaciones realizadas a la tesis. A la Dra. Teresa Terrazas porque su rigor científico y su actitud crítica fueron fundamentales para mejorar sustancialmente el manuscrito. A la Dra. Sonia Vázquez por la detallada revisión de la tesis.

Al Dr. Salvador Arias por revelarme la importancia de estudiar cactáceas columnares. A los biólogos Ulises Guzmán, Jerónimo Reyes y Carlos Gómez por su apoyo en el trabajo de campo. A la M. en C. Silvia Espinosa por haberme enseñado los secretos del trabajo de laboratorio y por la realización de las fotografías con microscopía electrónica de barrido. Al M. en C. Alejandro Martínez

y al Biol. Alfredo Gamboa por el trabajo fotográfico del capítulo II de esta tesis. Al Dr. Rafael Lira y a la Biol. Lilia Pérez por su disposición para leer el manuscrito.

A mis padres por su ejemplo. A mis hermanos, cuñados y sobrinos por brindarme siempre su apoyo inquebrantable.

Al Dr. Javier Caballero por su capacidad para ayudarme en incontables aspectos durante la realización de esta tesis y porque su presencia me dio la fuerza para enfrentar todos los obstáculos.

ÍNDICE

Resumen	3
Abstract	4
I. Introducción general	5
1.1. Literatura citada	26
II. Embriología de <i>Pachycereus militaris</i> (Audot) Hunt (Cactaceae)	38
Núñez-Mariel, C., E. M. Engleman y J. Márquez-Guzmán. 2001. Embriología de <i>Pachycereus militaris</i> (Audot) Hunt (Cactaceae). <i>Boletín de la Sociedad Botánica de México</i> 68: 5-13	
III. Estudio embriológico comparativo de cinco especies de la tribu Pachycereeae (Cactaceae)	48
3.1. Introducción	49
3.2. Materiales y métodos	54
3.3. Resultados	65
3.4. Discusión	93
3.5. Literatura citada	105
IV. Origen de la unisexualidad en <i>Pachycereus pringlei</i> (S. Watson) Britton & Rose (Cactaceae): un enfoque estructural	114
4.1. Introducción	115
4.2. Materiales y métodos	119
4.4. Resultados	121
4.3. Discusión	138
4.4. Literatura citada	151

V. Discusión general	157
5.1. Literatura citada	176
VI. Conclusiones generales	179

RESUMEN

Se describe el desarrollo de anteras, óvulos y semillas de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*. Se discute la importancia en la precisión de algunos términos utilizados para definir las estructuras reproductoras en la familia Cactaceae. Se analizaron 22 caracteres que describen la anatomía y la micromorfología de óvulos y semillas por medio de métodos cuantitativos. Los resultados obtenidos en estos análisis apoyan la importancia taxonómica de los caracteres embriológicos en la tribu Pachycereeae. Se sugiere su potencial para el estudio de otros taxa. Se caracterizaron embriológicamente los individuos femeninos y masculinos de *P. pringlei*. Se concluye que el origen ontogenético bisexual de las flores unisexuales apoya la hipótesis de que el ancestro de esta especie era hermafrodita. Las características de las alteraciones en el desarrollo de la antera de las flores femeninas de *P. pringlei* son similares a las observadas en especies con esterilidad masculina citoplásmica. Se identificaron dos morfos florales en los individuos masculinos. Algunos individuos masculinos presentan ovarios con protuberancias nucelares en el ápice, mientras que otros forman óvulos anormales que pueden contener sacos embrionarios estructuralmente bien diferenciados. Se observaron frutos en individuos masculinos conteniendo semillas con embriones maduros cubiertos parcialmente por la testa.

ABSTRACT

The development of anthers, ovules and seeds of *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans* is described. The importance and accuracy of the existing terminology for defining and describing reproductive structures in the Cactaceae family are reviewed. A total of 22 characters describing the anatomy and micro morphology of ovules and seeds were analyzed using quantitative methods. The results obtained in this study show that the embryological characters are important for the taxonomy of the tribe Pachycereeae. They may also have taxonomic potential for other the study of other taxa in the Cactaceae. Both male and female individuals of *P. pringlei* were embryologically characterized. The bisexual ontogenetic origin of the flowers observed, supports the hypothesis that the ancestor of this species was hermaphrodite. The characteristic alterations in anther development in the female flowers of *P. pringlei* are similar to those observed in plant species with cytoplasmic male sterility. Two male flower morphs were identified. Some male individuals present ovaries with nucelar protuberances in the apex while others form abnormal ovules which may contain structurally well differentiated embryo sacs. Fruits containing seeds with mature embryos partially covered by the testa were observed in male individuals.

CAPÍTULO I

Introducción general

La familia Cactaceae, a excepción de algunas especies del género *Rhipsalis*, es endémica de América y consta de aproximadamente 100 géneros y 1500 especies (Barthlott y Hunt, 1993). Las estimaciones de taxa representados en México varían de 563 especies y 48 géneros (Hernández y Bárcenas, 1994) a 850 especies y 50 géneros (Arias, 1993), encontrándose un alto porcentaje con una distribución restringida al territorio nacional, por lo que es considerado como uno de los centros de diversidad de la familia. Comparado con el resto de los países americanos, México ocupa el primer lugar en cuanto al número de especies y géneros (Arias, 1993). Después, en orden de importancia, se encuentran Bolivia, Brasil, Perú y Argentina, países que constituyen de manera conjunta otro centro de diversidad (Arias, 1993).

Alrededor del 45% de la superficie total del país está cubierta por matorrales xerófilos. En ellos se encuentran cactáceas de manera distintiva con respecto a otras familias y frecuentemente como componentes fundamentales del paisaje (Rzedowski, 1978). También pueden encontrarse en otros tipos de vegetación, tales como bosques tropicales subcaducifolios, caducifolios y espinosos (Bravo-Hollis, 1978; Arias, 1993).

La familia Cactaceae está dividida en cuatro subfamilias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Anderson, 2001). Esta última es la que presenta mayor diversidad, por lo que ha sido subdividida en nueve tribus, Echinocereae, Hylocereae, Cereae, Trichocereae, Notocactae, Rhipsalideae, Browningeae, Pachycereae y Cacteae (Barthlott y Hunt, 1993).

La tribu Pachycereae reúne a la mayoría de las cactáceas columnares y candelabroiformes que se distribuyen en Norteamérica. Está integrada por 13 géneros y 58 especies, de las cuales, el 93% se encuentra en México y el 81% es endémico (Dávila-Aranda *et al.* 2002).

Inicialmente, casi todas las especies de esta tribu pertenecían a *Cereus*, hasta que Britton y Rose (1909 en Gibson *et al.* 1986) las separaron en distintos géneros, muchos de los cuales permanecen hasta la actualidad. Buxbaum (1961), utilizando caracteres morfológicos de flores, frutos y semillas dividió a Pachycereae en cinco subtribus: Pterocereinae, Pachycereinae, Stenocereinae, Cephalocereinae y Myrtillocactinae. Posteriormente, modificó su sistema de clasificación y lo redujo a cuatro subtribus, colocando las especies que formaban parte de Cephalocereinae en Stenocereinae (Gibson y Horak, 1978).

En la propuesta taxonómica de Gibson y Horak (1978) para la tribu Pachycereae, se encuentran solamente dos grandes grupos, las subtribus Stenocereinae y Pachycereinae. En la primera, se encuentran las cactáceas columnares que

presentan células pigmentadas en los funículos, triterpenos, semillas rugosas y cuerpos de sílice en la epidermis e hipodermis. En la segunda, las especies que presentan alcaloides, cristales de oxalato de calcio en la epidermis, semillas lisas y funículos sin células pigmentadas. Sin embargo, no se tiene información sobre la presencia o ausencia de estos caracteres en muchas de las especies de la tribu, por lo que se requieren más estudios para definir los límites entre géneros y esclarecer sus relaciones filogenéticas (Gibson *et al.*, 1986).

Cornejo y Simpson (1997), entre los resultados de una investigación que tuvo por objeto describir y comparar la arquitectura y la morfología del tallo de 25 especies de cactus columnares y arborescentes norteamericanos, incluyen un cladograma para 48 especies de la tribu Pachycereeae. La topología de este cladograma apoya la división de la tribu Pachycereeae en las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae, aunque los autores no especifican el tipo de caracteres utilizados en su análisis.

Cota y Wallace (1997) estudiaron las relaciones filogenéticas del género *Ferocactus* con algunas especies de la tribu Pachycereeae. El análisis cladístico de este trabajo fue realizado tomando como base la variación en los sitios de restricción del genoma de los cloroplastos y también apoya la subdivisión de la tribu Pachycereeae en dos subtribus.

A partir del análisis filogenético de la tribu Pachycereeae con datos anatómicos, morfológicos y químicos, Terrazas y Loza-Cornejo (2002) consideran que

Stenocereus forma un clado monofilético, mientras que *Escontria*, *Myrtillocactus* y *Polaskia* integran otro clado. Así mismo, consideran que el género *Pachycereus* (*sensu* Barthlott y Hunt, 1993) es un grupo parafilético y que se debe evaluar la conformación de otro posible clado formado por *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia*, *Carnegiea* y *Pachycereus fulviceps*. Arias (2002) sostiene que la subtribu Pachycereinae es monofilética, solamente si se consideran dentro de este taxón a *Stenocereus aragonii* (F.A.C. Weber) Buxb. y *S. eichlamii* (Britton & Rose) Buxb.

No sólo existen problemas de delimitación entre subtribus, sino que varios de los géneros que integran la tribu Pachycereeae han tenido una complicada historia taxonómica (Cuadro 1). El género *Pachycereus* para Britton y Rose (1920) incluye once especies que, como característica distintiva, presentan flores y frutos cubiertos con escamas, tricomas y cerdas. Aunque producto de una confusión, estos autores identifican a *Pachycereus chrysomallus* con dos especies con características morfológicas y distribuciones geográficas completamente distintas, una de ellas reconocida por Sánchez-Mejorada (1973) como *Backebergia militaris* y la otra por Bravo-Hollis (1978) como *Mitrocereus fulviceps*. Por otra parte, la especie nombrada por Britton y Rose (1920) como *Pachycereus gaumeri*, es considerada por Buxbaum (1961), Bravo-Hollis (1978) y Gibson y Horak (1978) sinónimo de *Pterocereus gaumeri*. Posteriormente, Barthlott y Hunt (1993) retoman la propuesta de Britton y Rose (1920) con respecto a que *B. militaris*, *M. fulviceps* y *P. gaumeri* pertenecen a *Pachycereus*.

Cuadro 1. Sistemas de clasificación para el género *Pachycereus*.

Britton y Rose (1920)	Buxbaum (1961, 1963)	Bravo-Hollis (1978)	Gibson y Horak (1978)	Barthlott y Hunt (1993)
<i>Lemaireocereus hollianus</i> (F.A.C. Weber) Britton & Rose	<i>Pachycereus hollianus</i> (F.A.C. Weber) Buxb.	<i>Pachycereus hollianus</i>	<i>Pachycereus hollianus</i>	<i>Pachycereus hollianus</i>
<i>Lemaireocereus weberi</i> (J. M. Coult.) Backeb.	<i>Stenocereus weberi</i> (J.M. Coult.) Buxb.	<i>Stenocereus weberi</i>	<i>Pachycereus weberi</i> (J. M. Coult.) Backeb.	<i>Pachycereus weberi</i>
	<i>Lophocereus gatesii</i> M. E. Jones	<i>Lophocereus gatesii</i>	<i>Lophocereus gatesii</i>	<i>Pachycereus gatesii</i> (M.E. Jones) Hunt
<i>Lophocereus schottii</i> (Engelm.) Britton & Rose	<i>Lophocereus schottii</i>	<i>Lophocereus schottii</i>	<i>Lophocereus schottii</i>	<i>Pachycereus schottii</i> (Engelm. ex Coulter) Britton & Rose
	<i>Mitrocereus militaris</i> (Audot) Bravo	<i>Backebergia militaris</i> (Audot) Bravo ex Sánchez-Mej.	<i>Backebergia militaris</i>	<i>Pachycereus militaris</i> (Audot) D. R. Hunt
<i>Pachycereus chrysomallus</i> (Lem.) Britton & Rose	<i>Pseudomitrocereus fulviceps</i> (F.A.C. Weber) Bravo & Buxb.	<i>Mitrocereus fulviceps</i> (F.A.C. Weber ex K. Shum.) Backeb. ex Bravo	<i>Mitrocereus fulviceps</i>	<i>Pachycereus fulviceps</i> (Lem.) D. R. Hunt
<i>Pachycereus columna-trajani</i> (Karw. ex Pfeiff.) Britton & Rose	<i>Cephalocereus hoppendstedtii</i> (F.A.C. Weber) K. Schum.	<i>Cephalocereus hoppendstedtii</i>	<i>Cephalocereus hoppendstedtii</i>	<i>Cephalocereus apicicephalum</i> Dawson
<i>Pachycereus gaumeri</i> Britton & Rose	<i>Pterocereus gaumeri</i> (Britton & Rose) MacDoug. & Miranda	<i>Pterocereus gaumeri</i>	<i>Pterocereus gaumeri</i>	<i>Pachycereus gaumeri</i>
<i>Pachycereus grandis</i> Rose	<i>Pachycereus grandis</i>	<i>Pachycereus grandis</i>	<i>Pachycereus grandis</i>	<i>Pachycereus grandis</i>
<i>Pachycereus lepidanthus</i> (Eichlam) Britton y Rose	<i>Escontria lepidantha</i> (Eichlam) Buxb.	<i>Escontria lepidantha</i>	<i>Anisocereus lepidanthus</i> (Eichlam) Backeb.	<i>Pachycereus lepidanthus</i>
<i>Pachycereus marginatus</i> (DC.) Britton & Rose	<i>Stenocereus marginatus</i> (DC.) A. Berger & Buxb.	<i>Stenocereus marginatus</i>	<i>Pachycereus marginatus</i>	<i>Pachycereus marginatus</i>
<i>Pachycereus orcuttii</i> (K. Brandege) Britton & Rose	<i>Pachycereus orcuttii</i>	X <i>Pachgerocereus orcuttii</i> (K. Brandege) Moran	X <i>Pachgerocereus orcuttii</i>	X <i>Pachrocactus orcuttii</i> (K. Brandege) Rowley
<i>Pachycereus pecten-aboriginum</i> (Engelm.) Britton & Rose	<i>Pachycereus pecten-aboriginum</i>	<i>Pachycereus pecten-aboriginum</i>	<i>Pachycereus pecten-aboriginum</i>	<i>Pachycereus pecten-aboriginum</i>
<i>Pachycereus pringlei</i> (S. Watson) Britton & Rose	<i>Pachycereus pringlei</i>	<i>Pachycereus pringlei</i>	<i>Pachycereus pringlei</i>	<i>Pachycereus pringlei</i>
<i>Pachycereus ruficeps</i> F.A.C. Weber	<i>Pilocereus ruficeps</i>	<i>Neobuxbaumia macrocephala</i> (F.A.C. Weber) Dawson	<i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	<i>Neobuxbaumia macrocephala</i>

Pachycereus marginatus y *P. weberi* son reconocidas por Gibson y Horak (1978), Barthlott y Hunt (1993), pero consideradas parte del género *Stenocereus* por Buxbaum (1961) y Bravo-Hollis (1978). *Pachycereus lepidanthus sensu* Britton y Rose (1920) es reconocida como *Escontria lepidantha* por Buxbaum (1961) y Bravo-Hollis pero como *Anisocereus lepidanthus* por Gibson y Horak (1978) y nuevamente incluida en *Pachycereus* por Barthlott y Hunt (1993). *Pachycereus gatesii* y *P. schottii sensu* Barthlott y Hunt (1993) son consideradas como parte del género *Lophocereus* por Bravo-Hollis y Gibson y Horak (1978).

Algunas especies de *Pachycereus* han mantenido su posición a través de los diferentes sistemas de clasificación. Britton y Rose (1920), Buxbaum (1963), Bravo-Hollis (1978), Gibson y Horak (1978) y Barthlott y Hunt (1993) coinciden en la ubicación taxonómica de *Pachycereus grandis*, *P. pecten-aboriginum* y *P. pringlei*. *Pachycereus hollianus* es aceptada por los autores anteriores con excepción de Britton y Rose (1920).

Hasta antes del estudio filogenético realizado por Arias (2002) para *Pachycereus* no se conocía ninguna sinapomorfia que delimitara a este género, de tal manera que el número de especies aceptadas por los autores de los distintos sistemas de clasificación para este taxón ha sido muy variable. En los tratamientos taxonómicos de Britton y Rose (1920), Buxbaum (1961), Bravo-Hollis (1978), Gibson y Horak (1978) y Barthlott y Hunt (1993), la distinción entre taxa está sustentada en conjuntos de caracteres que forman una intrincada red de

semejanzas y diferencias que es difícil analizar cuando se pretende entender las relaciones interespecíficas o intergenéricas.

Arias (2002) llevó a cabo el análisis cladístico de *Pachycereus sensu* Barthlott y Hunt (1993) a partir de caracteres morfológicos, anatómicos y moleculares. Este autor propone que *Pachycereus* sólo debe estar constituido por las especies *P. grandis*, *P. pecten-aboriginum*, *P. pringlei*, *P. tepamo* S. Gama y S. Arias y *P. weberi*. Las sinapomorfias morfológicas que delimitan a este género, según Arias (2002), son la presencia de un surco interareolar y la forma de la flor de tipo G (pericarpelo amplio, constricción del tubo receptacular tenue y tubo receptacular ligeramente abierto).

En uno de los árboles más parsimoniosos obtenidos por Arias (2002), mediante el análisis de evidencia total, se pueden reconocer tres clados principales dentro de la subtribu Pachycereinae, el grupo *Lemaireocereus*, el grupo *Cephalocereus* y el grupo *Pachycereus*. El grupo *Lemaireocereus* está constituido por *P. hollianus* y *P. lepidanthus*. El grupo *Cephalocereus* está conformado por *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia* y *P. fulviceps*, encontrándose esta última especie como grupo basal. El grupo *Pachycereus* contiene dos subgrupos principales, el primero incluye al clado formado por las cinco especies propuestas por Arias (2002) para integrar al género *Pachycereus* (*P. grandis*, *P. pecten-aboriginum*, *P. pringlei*, *P. tepamo* y *P. weberi*), *Carnegiea gigantea* (Engel.) Britton & Rose como grupo hermano de este género y al clado *S. aragonii* y *S. eichlamii*. El segundo subgrupo incluye a *P. gatesii*, *P. schottii* y *P. marginatus* formando un clado, *P. gaumeri*

como el grupo hermano de este clado y *P. militaris* en una posición basal para el subgrupo.

Tomando como base los resultados anteriores, Arias (2002) propone que *P. fulviceps*, *P. gaumeri* y *P. militaris* sean reconocidas como los géneros monotípicos *Pseudomitrocereus*, *Pterocereus* y *Backebergia*, respectivamente; *P. gatesii*, *P. marginatus* y *P. schottii* se transfieran al género *Lophocereus*; *P. hollianus* y *P. lepidanthus* formen parte del género *Lemaireocereus* y que *S. aragonii* y *S. eichlami* pertenezcan al género *Marshallocereus* dentro la subtribu Pachycereinae.

Para la realización de las clasificaciones de la tribu Pachycereeae se han utilizado datos morfológicos, anatómicos, químicos y moleculares, pero los caracteres embriológicos no han sido todavía suficientemente explorados. De acuerdo con Stuessy (1990), la estrecha relación de la embriología con otras disciplinas como la morfología, la anatomía, la citología y la morfogénesis, hace que las fronteras entre estos tipos de datos no sean muy claras y que en consecuencia no se considere a la embriología como una disciplina independiente o que sus datos se utilicen con poca frecuencia en estudios taxonómicos.

Davis (1966), en una de las primeras obras sobre embriología sistemática, define los caracteres embriológicos como todos los procesos y estructuras asociados a la esporogénesis, gametogénesis y embriogénesis. Tobe (1989) amplía esta definición al precisar que la embriología describe la diversidad estructural de la

micro y megasporogénesis, del desarrollo del micro y megagametofito, de la fecundación y del desarrollo del embrión, del endospermo y de la cubierta seminal.

Se han realizado varios intentos por recopilar la información sobre la embriología de cada familia de angiospermas y revisar los caracteres de importancia taxonómica (Maheshwari, 1950; Davis, 1966; Seshachar, 1970; Palser, 1975; Bhojwani y Bhatnagar, 1978; Herr, 1984; Tobe, 1989; Stuessy, 1990; Takhtajan, 1991, Johri *et al.*, 1992). Stuessy (1990) sostiene que la variación de los caracteres embriológicos puede ser utilizada para demarcar taxa y para analizar las posibles correspondencias con los caracteres morfológicos. En términos generales, la mayoría de los autores citados coinciden en subrayar que la importancia de estos caracteres depende del grupo en estudio y de su nivel en la jerarquía taxonómica.

Tobe (1989) discute la importancia de los caracteres embriológicos en la sistemática y su utilidad para cada categoría taxonómica con base en un extenso estudio sobre la embriología del orden Myrtales. Este autor sintetiza la información de los trabajos clásicos de embriología sistemática (Maheshwari, 1950; Davis, 1966; Palser, 1975; Herr, 1984) y genera una lista con más de cincuenta caracteres embriológicos, destacando la importancia de definir con precisión sus respectivos estados de carácter. Además plantea que los caracteres que son consistentes en una familia, pueden no serlo en otra, incluso perteneciendo al mismo orden, o que también se pueden encontrar casos de caracteres que son diversos a nivel de familia pero consistentes en alguna subfamilia, tribu o género.

Por su parte, Stuessy (1990) y Tucker y Douglas (1993) sostienen que los caracteres ontogenéticos se distinguen de otros, por tener el potencial para descubrir homologías ocultas en las estructuras florales o vegetativas cuando han alcanzado su madurez. Los caracteres embriológicos, en la medida en que describen procesos de desarrollo como cualquier otro carácter ontogenético, también pueden ser importantes para identificar estructuras homólogas entre distintos taxa, así como para comprender el origen de formas de organización complejas en las estructuras reproductoras maduras.

Según Tobe (1989), para poder caracterizar embriológicamente una familia es necesario, por una parte, hacer una selección de taxa representativos de las categorías de menor rango, como pueden ser subfamilias, tribus, subtribus, secciones o géneros y, posteriormente, realizar una evaluación crítica de los caracteres analizados con el fin de contribuir a la realización de hipótesis filogenéticas.

Aunque se han descrito características embriológicas en algunas especies de la familia Cactaceae, todavía no está documentado el desarrollo de anteras, óvulos y semillas en especies representativas de la mayoría de las tribus de la subfamilia Cactoideae (Cuadro 2).

Algunos trabajos sobre cactáceas están enfocados al estudio comparativo del polen (Kurtz, 1948; Leuenberger, 1976a, 1976b; Tsukada, 1964; Jarvis, 1981), de

**Cuadro 2. Relación de estudios del desarrollo de anteras,
óvulos y semillas de la familia Cactaceae sensu Barthlott y Hunt (1999).**

ESPECIE	REFERENCIA	OBJETO DE ESTUDIO
SUBFAMILIA PERESKIOIDEAE		
<i>Pereskia aculeata</i> Mill.	Tiagi, 1967	antera, óvulo y semilla
<i>P. bleo</i> (Kunth) DC.	Tiagi, 1967	antera, óvulo y semilla
<i>P. grandifolia</i> Haw.	Tiagi, 1967	antera, óvulo y semilla
<i>P. lychnidiflora</i> DC.	Jiménez, 2002	antera, óvulo y semilla
<i>P. nemorosa</i> Rojas (<i>P. amapola</i> F. A. C. Weber)	Neumann, 1935	antera y óvulo
SUBFAMILIA OPUNTIOIDEAE		
<i>Opuntia aurantiaca</i> Lindl.	Archibald, 1939 Chopra, 1957	óvulo y semilla óvulo
<i>O. dillenii</i> (Ker-Gawl.) Haw.	Tiagi, 1954 Maheshwari y Chopra, 1955	antera y óvulo óvulo y semilla
<i>O. spinosissima</i> Mill. (<i>Consolea spinosissima</i> (Mill.) Lem.)	Strittmatter <i>et al.</i> , 2002	antera, óvulo y semilla
<i>O. stenopetala</i> Engelm.	Orozco, 2002	antera, óvulo y semilla
<i>O. tomentosa</i> Salm-Dick var. <i>tomentosa</i> Salm-Dick	Flores, 2002	antera, óvulo y semilla
SUBFAMILIA CACTOIDEAE		
Tribu Cacteeae		
<i>Astrophytum myriostigma</i> Lem.	Engleman, 1960	óvulo y semilla
<i>Ferocactus wislizeni</i> (Engelm.) Britton & Rose	Kapil y Prakash, 1969	antera, óvulo y semilla
<i>Mammillaria rhodantha</i> Link & Otto y <i>M. compressa</i> DC.	Hernández-García y García-Villanueva, 1991	óvulo y semilla
<i>Sclerocactus papyracanthus</i> (Engelm.) Taylor (<i>Toumeyia papyracantha</i> (Engelm.) Britton & Rose)	Engleman, 1960	óvulo y semilla
<i>Thelocactus bicolor</i> (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose	Engleman, 1960	óvulo y semilla
Tribu Cereeeae		
<i>Cereus jamacaru</i> DC.	Guignard, 1886 Kapil y Prakash, 1969	fecundación antera, óvulo y semilla
Tribu Echinocereeeae		
<i>Acanthocereus tetragonus</i> (L.) Hummelinck (<i>Cereus pentagonus</i> (L.) Haw.)	Guignard, 1886	fecundación
<i>Harrisia martini</i> (Labour.) Britton (<i>Cereus martini</i> Labour.)	Guignard, 1886	fecundación
<i>H. tortuosa</i> (Forbes) Britton & Rose (<i>Cereus tortuosus</i> Forbes)	Guignard, 1886	fecundación
Tribu Hylocereeeae		
<i>Hylocereus undatus</i> (Haw.) Britton & Rose	Banerji y Sen, 1954	óvulo
Tribu Pachycereeeae		
<i>Pachycereus militaris</i> (Audot) D. R. Hunt	Núñez-Mariel <i>et al.</i> , 2001	antera, óvulo y semilla
Tribu Trichocereeeae		
<i>Cleistocactus baumannii</i> (Lem.) Lem. (<i>Cereus baumannii</i> Lem.)	Guignard, 1886	fecundación

la anatomía y morfología de óvulos y semillas (Flores, 1976; Flores y Engleman, 1976; Hernández-García y García-Villanueva, 1991) o a la descripción micromorfológica de las semillas (Elizondo *et al.*, 1994; Leuenberger, 1974; Barthlott y Voit, 1979; Taylor y Clark, 1983; Friedrich y Glaetzle, 1983; Bregman, 1992; Maiti *et al.*, 1994; Barthlott y Hunt, 2000; Arias, 2002) con fines taxonómicos.

Hasta la fecha sólo se ha publicado un trabajo sobre el desarrollo de las estructuras reproductoras en una especie de la tribu Pachycereeae (Núñez-Mariel *et al.*, 2001); otros estudios para este grupo taxonómico solamente describen la morfología y anatomía del polen, óvulos y semillas una vez que han alcanzado la madurez. Buxbaum (1955, 1961, 1963), quien puso especial énfasis en la importancia de las estructuras reproductoras para la realización de sistemas de clasificación, describió detalladamente óvulos, semillas y plántulas de la tribu Pachycereeae. Flores (1976) y Flores y Engleman (1976) analizaron caracteres cuantitativos y cualitativos de óvulos y semillas de cinco especies de esta tribu, como parte de una investigación que tenía por objetivo comparar la variación anatómica y morfológica de estas estructuras en la familia Cactaceae. Gibson *et al.* (1986) examinaron la microescultura de la cubierta seminal en algunas especies de la tribu y plantearon que este tipo de caracteres eran significativos en la delimitación de subtribus y géneros. Gama-López *et al.* (1997) estudiaron la morfología de los granos de polen de *P. hollianus*, *P. grandis*, *P. marginatus*, *P. pecten-aboriginum*, *P. pringlei*, *P. tepamo* y *P. weberi*. Barthlott y Hunt (2000) publicaron la descripción micromorfológica de las semillas de la subfamilia Cactoideae, incluyendo algunas especies representativas de Pachycereeae. Arias

(2002) llevó a cabo el estudio comparativo de la micromorfología de las semillas del género *Pachycereus sensu* Barthlott y Hunt (1993), utilizando la terminología de Barthlott y Hunt (2000) y análisis multivariados para detectar los caracteres capaces de discriminar entre especies.

La incorporación de los caracteres embriológicos a los análisis filogenéticos de la familia Cactaceae ha sido limitada. Esto es debido a que muchos de los estudios embriológicos de esta familia sólo abordan una parte del desarrollo de las estructuras reproductoras y, por lo tanto, se carece de información sobre caracteres que podrían ser taxonómicamente significativos. Además, la terminología empleada para describir algunas características de las estructuras reproductoras en cactáceas puede ser contradictoria, por lo que su utilización en los estudios filogenéticos podría conducir a interpretaciones equívocas de la variación de estos caracteres dentro de la familia.

Se han realizado esfuerzos para combinar distintas fuentes de información taxonómica con el objeto de entender las relaciones filogenéticas de la tribu Pachycereeae (Gibson y Horak, 1978; Gibson *et al.*, 1986; Arias, 2002; Terrazas y Loza-Cornejo, 2002). Sin embargo, el uso de caracteres embriológicos se ha concretado a la descripción de algunos atributos micromorfológicos de semillas maduras, pero no se han analizado otras estructuras reproductoras, tales como anteras y óvulos.

El estudio embriológico de un grupo de especies relacionadas filogenéticamente es un punto de partida para reconocer y definir caracteres que pueden ser incorporados a futuros análisis cladísticos y de esta forma, contribuir al descubrimiento de posibles sinapomorfias que determinen la delimitación de un taxón.

Debido a que la embriología estudia los procesos involucrados en la formación de estructuras reproductoras, además de contribuir a la resolución de problemas taxonómicos, también aporta información relevante en el estudio de la diversidad sexual en las angiospermas. La variación de algunos caracteres embriológicos asociados al desarrollo del polen o de los óvulos, puede provocar la formación de flores estériles masculinas o femeninas.

Según Ainsworth (2000), una pregunta fundamental en relación con el establecimiento de sistemas sexuales ginodioicos, androdioicos, dioicos o trioicos en las angiospermas, se refiere a la naturaleza de las rutas evolutivas que condujeron a la unisexualidad. Este autor sostiene que la variación en el tiempo y el tipo de las alteraciones o la supresión del desarrollo de alguno de los órganos sexuales es sumamente variable entre especies, por lo que es posible inferir que los mecanismos genéticos y los procesos evolutivos involucrados también son diversos.

El estudio comparativo de la embriología de los morfos sexuales en una especie, permite reconocer las causas estructurales que impiden la formación de óvulos o

polen viables en las flores unisexuales, y de esta manera, contribuye a la comprensión de los mecanismos que determinan el sexo en las plantas.

De acuerdo con Bawa y Beach (1981), entre los aspectos que se abordan en el estudio de los sistemas sexuales en plantas se encuentran la distribución espacial y temporal de las funciones masculinas y femeninas, así como las interacciones ecológicas entre individuos capaces de cruzarse entre sí y su relación con los polinizadores.

Para Charlesworth (2002), las especies con funciones sexuales femeninas y masculinas en la misma flor o en flores separadas pero en un mismo individuo, son "sexualmente monomórficas", mientras que aquéllas que poseen individuos con sexos separados (dioicas) o con individuos hermafroditas y unisexuales (androdioicas y ginodioicas) son "sexualmente polimórficas".

Aun cuando la mayoría de las cactáceas son hermafroditas (Parfitt, 1985), se han reportado algunas especies con sistemas sexuales polimórficos (Lindsay y Dawson, 1952; Ganders y Kennedy, 1978; Kimnach, 1982; Leuenberger, 1986; del Castillo y González-Espinosa, 1988; Hoffman, 1992; Fleming *et al.*, 1994; Valiente-Banuet *et al.*, 1997; Orozco, 2002; Strittmatter *et al.*, 2002). Sin embargo, estos estudios todavía son insuficientes para reflejar la diversidad de los sistemas sexuales en la familia Cactaceae. Algunos trabajos fueron realizados con fines taxonómicos y se concretan a la descripción morfológica de las flores, lo que puede ocultar su verdadera condición sexual, puesto que en ciertos casos, los

morfos florales pueden tener la misma apariencia externa pero ser funcionalmente masculinos o femeninos.

Lindsay y Dawson (1952) observaron flores unisexuales en *Mammillaria neopalmeri* Craig, aunque desafortunadamente no precisan si son femeninas o masculinas. Ganders y Kennedy (1978) sostienen que la población que estudiaron de *Mammillaria dioica* K. Brandegees sólo presenta individuos hermafroditas y femeninos, por lo que debe ser considerado como un sistema ginodioico, a diferencia de Brandegees (1897 en Ganders y Kennedy, 1978), quien señala que el sistema sexual de esta especie incluye individuos hermafroditas, masculinos y femeninos. Kimnach (1982) considera que el sistema reproductor de *Selenicereus innesii* Kimnach es dioico, a pesar de que sólo incluye flores perfectas y femeninas en su diagnóstico, lo que en realidad correspondería con un sistema ginodioico.

Leuenberger (1986), tomando como base ejemplares de herbario y observaciones ocasionales en el campo, considera que *Pereskia portulacifolia* (L.) Haw. presenta un sistema dioico y reporta la presencia de flores masculinas en *Pereskia quisqueyana* Liogier, señalando que se requieren más estudios para determinar el sistema reproductor en esta especie, pues no se tenían registros de flores con óvulos normales y frutos. Además confirma las observaciones de Areces (1984 en Leuenberger, 1986) acerca de la presencia de flores masculinas y femeninas en *Pereskia zinniiflora* DC. Del Castillo y González-Espinosa (1988) describieron la morfología floral de los individuos hermafroditas, masculinos y femeninos de *Opuntia robusta* Wendland ex Pfeiff. (sistema trioico). Hoffman (1992) concluye

que la población de *Echinocereus coccineus* Engelm. estudiada, presenta plantas con flores aparentemente perfectas pero incapaces de producir frutos (individuos funcionalmente masculinos) y plantas que pueden formar frutos pero no polen (individuos funcionalmente femeninos).

Entre las investigaciones sobre sistemas sexuales en cactáceas, solamente se han realizado estudios embriológicos comparativos entre morfos sexuales en las especies *Consolea spinosissima* (Mill.) Lem. (Strittmatter *et al.*, 2002) y *Opuntia stenopetala* Engelm. (Orozco, 2002), ambas integrantes de la subfamilia Opuntioideae.

Las especies de la tribu Pachycereeae en las que se ha demostrado la presencia de un sistema sexual diferente al hermafrodita son *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeb. (Valiente-Banuet *et al.*, 1997) y *P. pringlei* (Fleming *et al.*, 1994). Valiente-Banuet *et al.* (1997) encontraron que *N. mezcalaensis* presenta un sistema sexual androdioico. Según estos autores, los granos de polen de los individuos hermafroditas y de los individuos masculinos pueden formar tubos polínicos, pero las flores de estos últimos tienen el gineceo completamente reducido y los óvulos nunca alcanzan la madurez.

Fleming *et al.* (1994) describieron a *P. pringlei* como una especie trioica, estimaron la adecuación de los morfos sexuales y analizaron la influencia de los polinizadores en el mantenimiento del sistema reproductor en algunas poblaciones de esta especie. Las poblaciones trioicas de *P. pringlei* presentan individuos

hermafroditas, masculinos, femeninos y neutros (Fleming *et al.*, 1994). De acuerdo con los resultados de Fleming *et al.* (1994), las flores masculinas de *P. pringlei* tienen anteras con polen y ovario sin óvulos o con óvulos muy pequeños; en cambio, las flores femeninas presentan ovarios con óvulos pero anteras sin polen y las flores de los individuos neutros son completamente estériles, las anteras no tienen polen y el ovario presenta las mismas características que las flores masculinas. Según las observaciones de estos autores, la expresión del sexo en los individuos marcados fue constante durante los años en que se realizó la investigación. Posteriormente, Fleming *et al.* (1998) encontraron que *P. pringlei* presenta tanto poblaciones trioicas como ginodioicas.

Las especies trioicas son muy raras en las angiospermas (Richards, 1986; Ainsworth, 2000). Una ventaja del estudio embriológico de los sistemas trioicos con respecto a los dioicos, es la posibilidad de comparar entre morfos hermafroditas, masculinos y femeninos que descienden de un ancestro común inmediato y que comparten las mismas condiciones ambientales, ya que para detectar las irregularidades en el desarrollo del gineceo o androceo en las flores unisexuales, es importante tomar como modelo la ontogenia de las flores perfectas.

Los estudios ecológicos sobre sistemas reproductores en las angiospermas, generalmente definen las clases sexuales en términos de la funcionalidad de sus órganos, es decir, por su capacidad para producir polen o semillas viables (Bawa y Beach, 1981), pero no prestan demasiada atención a las posibles variaciones en

las formas de desarrollo entre flores de un mismo sexo. Estas variaciones pueden ser identificadas mediante un estudio embriológico comparativo de los distintos morfos sexuales y su conocimiento es fundamental para sentar las bases que permitan estudiar los mecanismos moleculares y los patrones evolutivos que han participado en la separación de sexos en las plantas (Bawa y Beach, 1981; Lebel-Hardenack y Grant, 1997; Barret, 1998; Ainsworth, 2000).

Considerando el desconocimiento de la embriología en la tribu Pachycereeae, la complicada historia taxonómica del género *Pachycereus*, la importancia de los caracteres embriológicos en la sistemática y tomando en cuenta que la especie tipo de *Pachycereus* (*P. pringlei*) presenta individuos con flores bisexuales e individuos con flores funcionalmente unisexuales, en esta tesis se pretendió abordar las siguientes interrogantes: (1) ¿existen diferencias en el desarrollo de anteras, óvulos y semillas en las especies que integran al género *Pachycereus sensu* Barthlott y Hunt (1993)? (2) ¿existe variación en los caracteres embriológicos entre *P. fulviceps*, *P. gaumeri* y *P. militaris* (consideradas géneros monotípicos por Gibson y Horak, 1978) con respecto a *P. pringlei* (especie tipo del género)? (3) ¿qué tipo de caracteres embriológicos pueden tener importancia taxonómica a nivel específico o genérico en la tribu Pachycereeae? (4) ¿cómo es la embriología de los individuos femeninos y masculinos de *P. pringlei*? (5) ¿cuáles son las alteraciones en el desarrollo de las anteras que impiden la formación de polen viable en las flores femeninas de *P. pringlei*? (6) ¿en qué etapa del desarrollo de las flores masculinas se detiene o altera la diferenciación de los óvulos en *P. pringlei*?

Debido a las implicaciones que la embriología puede tener en la resolución de problemas taxonómicos, así como, en la comprensión de los procesos evolutivos que han dado lugar a la diversidad sexual en la familia Cactaceae, el objetivo de esta investigación fue caracterizar embriológicamente a cinco especies de cactáceas columnares endémicas de México (*Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*), precisar los términos utilizados en la descripción de estructuras reproductoras en la familia, proponer caracteres de importancia taxonómica en la tribu Pachycereeae, aportar elementos nuevos para la filogenia del grupo e identificar las características del desarrollo de los órganos sexuales que han conducido a la unisexualidad en *P. pringlei*.

El segundo capítulo de esta tesis comprende el estudio embriológico de *Pachycereus militaris*, una especie que es catalogada como rara de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994) y que se encuentra en el Apéndice I de la CITES (Hunt, 1999). Este es el primer estudio en el que se describe el desarrollo de antera, óvulo y semilla de una especie de la tribu Pachycereeae y fue publicado en el Boletín de la Sociedad Botánica de México (Núñez-Mariel *et al.* 2001).

El tercer capítulo comprende el estudio comparativo de la embriología de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*. Incluye también el análisis por medio de métodos numéricos de los

caracteres que describen la anatomía y micromorfología de óvulos y semillas.

El cuarto capítulo está dedicado al estudio embriológico comparativo de los individuos hermafroditas, femeninos y masculinos de *Pachycereus pringlei*. A partir de la descripción del desarrollo de las estructuras reproductoras, se determina el momento de detención en la formación de polen y semillas viables, lo que conduce a la formación de flores funcionalmente unisexuales.

El quinto capítulo corresponde con la discusión general de la tesis y el capítulo sexto con las conclusiones generales.

Literatura citada

- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Anderson, E. F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press. Portland.
- Archibald, E. E. A. 1939. The development of the ovule and seed of jointed cactus (*Opuntia aurantiaca*, Lindley). *South African Journal of Science* 36: 195-211.
- Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* Vol. Esp. 44: 109-115.
- Arias, S. 2002. Filogenia del género *Pachycereus* (Pachycereeae, Cactaceae). Tesis doctoral. Programa de Botánica. Colegio de Postgraduados. Texcoco.
- Banerji, I. y S. Sen. 1954. A contribution to the cytology and embryology of *Hylocereus undatus* (Haw.) Br. & R. *Bulletin of the Botanical Society of Bengal* 8: 18-23.
- Barret, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3: 335-341.

- Barthlott, W. y D. R. Hunt. 1993. Cactaceae. *En*: K. Kubitzki, J. G. Rohwer y V. Bittrich (eds.): The Families and Genera of Vascular Plants. Vol. II. Springer-Verlag. Berlin. pp. 161-197.
- Barthlott, W. y D. R. Hunt. 2000. Seed-diversity in the Cactaceae: subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research* 5: 173 pp.
- Barthlott, W. y G. Voit. 1979. Mikromorphologie der samenschalen un taxonomie der Cactaceae ein raster-elektronenmikropischer überlick. *Plant Systematic and Evolution* 132: 205-229.
- Bawa, K. S. y J. H. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of Missouri Botanical Garden* 68: 254-274.
- Bhojwani, S. S. y S. P. Bhatnagar. 1978. The Embryology of Angiosperms. Vikas Publishing House. Delhi.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. 2ª ed. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bregman, R. 1992. Seed studies in the subtribu Borzicactinae Buxbaum (Cactaceae; morphology, taxonomy, phylogeny and biogeography. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 114(2): 201-250.

- Britton, N. L. y J. N. Rose. 1920. The Cactaceae. Vol. 2. Carnegie Institution.
Washington D. C.
- Buxbaum, F. 1955. Section III. Fruits and Seeds. *En:* K. Edwin B. (ed.) Morphology
of Cacti. Abbey Garden Press. Pasadena. pp. 177-223.
- Buxbaum, F. 1961. Die Entwicklungslinien der tribus Pachycereae - F. Buxb.
Botanische Studien 12: 88-107.
- Buxbaum, F. 1963. Gattung *Pachycereus*. *En:* H. Kranz (ed.) Die Kakteen.
15.IV.CIIIb. pp. .
- Cornejo, D. O. y B. B. Simpson. 1997. Analysis of form and function in North
American Columnar Cacti (Tribe Pachycereae). *American Journal of Botany*
84: 1482-1501.
- Cota, H. y R. S. Wallace. 1997. Chloroplast DNA evidence for divergence in
Ferocactus and its relationships to North American columnar cacti
(Cactaceae: Cactoideae). *Systematic Botany* 22: 529-542.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88:
94-101.

- Chopra, R. N. 1957. The mode of embryo sac development in *Opuntia aurantiaca* Lindl.- A reinvestigation. *Phytomorphology* 7: 403-406.
- Dávila-Aranda, P., S. Arias-Montes, R. Lira-Saade, J. L. Villaseñor y A. Valiente-Banuet. 2002. Phytogeography of the columnar cacti (tribe Pachycereeae) in Mexico: a cladistic approach. En: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.). *Columnar Cacti and Their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson. pp. 25-41.
- Davis, G. L. 1966. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Del Castillo, R. y M. González-Espinosa. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71: 185-196.
- Elizondo, J., J. Valdés, S. Arias y S. L. Hatch. 1994. Micromorfología de las semillas de algunas especies de la tribu Cacteeae (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 39: 59-67.
- Engelman, E. M. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. *American Journal of Botany* 47: 460-467.

- Fleming, T. H., S. Maurice, S. L. Buchmann y M. D. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81(7): 858-867.
- Fleming, T. H., S. Maurice y J. L. Hamrick. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* 12: 279-289.
- Flores, E. M. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. II Caracteres de valor taxonómico. *Revista de Biología Tropical*. 24(2): 299-321.
- Flores, E. M. y E. M. Engleman. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. I Desarrollo y estructura. *Revista de Biología Tropical* 24(2): 199-227.
- Flores, LI. 2002. Estudio embriológico de *Opuntia tomentosa* Salm -Dyck var. *tomentosa* Salm-Dick. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Friedrich, H. y W. Glaetzle. 1983. Seed-morphology as an aid to classifying the genus *Echinopsis* Zucc. *Bradleya* 1: 91-104.

- Gama-López, S., S. Arias-Montes y J. L. Alvarado. 1997. Morfología de los granos de polen de las especies del género *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae). Resúmenes del I Congreso Nacional sobre Cactáceas. Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos, IPN. Montecillo, México.
- Ganders, F. R. y H. Kennedy. 1978. Gynodioecy in *Mammillaria dioica* (Cactaceae). *Madroño* 25: 234.
- Gibson, A. C. y K. E. Horak. 1978. Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 999-1057.
- Gibson, A. C., K. C. Spencer, R. Bajaj y J. L. McLaughlin. 1986. The ever-changing landscape of cactus systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 532-555.
- Guignard, M. L. 1886. Observations sur les ovules et la fécondation des cactées. *Bulletin de la Société Botanique de France* 33: 276-280.
- Hernández, H. y R. Bárcenas. 1994. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. *Conservation Biology* 9(5): 1176-1188.
- Hernández-García, G. y E. García-Villanueva. 1991. Anatomía comparada de óvulos y semillas de dos especies del género *Mammillaria* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 51: 25-38.

Herr, J. M. J. 1984. Embryology and taxonomy. *En*: B. M. Johri (ed.) Embryology of Angiosperms. Springer Verlag. Berlin. pp. 647-696.

Hoffman, M. T. 1992. Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany* 79: 1382-1388.

Hunt, D. R. (comp.). 1999. CITES Cactaceae Checklist. 2nd ed. Royal Botanic Gardens Kew & International Organization for Succulent Plant Study. Milborne Port.

Jarvis, C. E. 1981. Pollen morphology in the subtribe Borzicactinae F. Buxb. (Cactaceae). *The Cactus and Succulent Journal of Great Britain* 43(4): 109-113.

Jiménez, K. 2002. Embriología de *Pereskia lychnidiflora* (De Candolle 1828). Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Johri, B. M., K. B. Ambegaokar y P. S. Srivastava. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. New York.

Kapil, R. N. y N. Prakash. 1969. Embryology of *Cereus jamacaru* and *Ferocactus wislizeni* and comments on the systematic position of the Cactaceae. *Botaniska Notiser* 122: 409-426.

Kimnach, M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)* 54: 3-7.

Kurtz, E. B. 1948. Pollen grain characters of certain Cactaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 75(5): 516-522.

Lebel-Hardenack, S. y S. R. Grant. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science* 2(4): 130-136.

Leuenberger, B. E. 1974. Testa surface characters of Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)* 46(4): 175-180.

Leuenberger, B. E. 1976a. Die Pollenmorphologie der Cactaceae und ihre Bedeutung für die Systematik. *Dissertationes Botanicae* 31: 1-321.

Leuenberger, B. E. 1976b. Pollen morphology of the Cactaceae. *The Cactus and Succulent Journal of Great Britain* 38(4): 79-94.

Leuenberger, B. E. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). *Memoirs of The New York Botanical Garden* 41: 1-141.

- Lindsay, G. y E. Y. Dawson. 1952. Mammillarias of the islands of Northwestern Baja California, Mexico. *Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)* 24: 76-84.
- Maheshwari, P. 1950. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill. New York.
- Maheshwari, P. y R. N. Chopra. 1955. The structure and development of the ovule and seed of *Opuntia dillenii* Haw. *Phytomorphology* 5: 112-122.
- Maiti, R. K., J. L. Hernández-Piñero y M. Valdez-Marroquín. 1994. Seed ultrastructure and germination of some species of Cactaceae. *Phyton* 55: 97-105.
- Neumann, M. 1935. Die Entwicklung des Pollens, der Samenanlage und des Embryosackes von *Pereskia amapola* var. *argentina*. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 84: 1-30.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994). 1994. SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social): Diario Oficial de la Federación del 16 de mayo de 1994. vol. Tomo CDLXXXVIII. No. 10.

- Nuñez-Mariel, C., E. M. Engleman y J. Márquez-Guzmán. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 68: 5-13.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelmann (Cactaceae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Palser, B. F. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: embryology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 621-646.
- Parfitt, B. D. 1985. Dioecy in North American Cactaceae: a review. *SIDA* 11: 200-206.
- Richards, A. J. 1986. Plant Breeding Systems. Unwin Hyman. London.
- Rzedowski, J. 1978. La vegetación de México. LIMUSA. México.
- Sánchez-Mejorada, H. 1973. The correct name of the grenadier's cap. *Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)* 45: 171-174.
- Seshachar, B. R. 1970. Proceedings of the Symposium on Comparative Embryology of Angiosperms. *Indian National Science Academy Bulletin* 41: 29-35.

- Strittmatter, L. I., V. Negrón-Ortiz y J. R. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* 89(9): 1373-1387.
- Stuessy, T. F. 1990. Plant Taxonomy : The Systematic Evaluation of Comparative Data. Columbia University Press. New York.
- Takhtajan, A. 1991. Evolutionary Trends in Flowering Plants. Columbia University Press. New York.
- Taylor, N. P. y J. Y. Clark. 1983. Seed-morphology and classification in *Ferocactus* subg. *Ferocactus*. *Bradleya* 1: 3 -16.
- Terrazas, T. y S. Loza-Cornejo. 2002. Phylogenetic relationships of Pachycereeae: a cladistic analysis based on anatomical-morphological data. *En*: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.). Columnar Cacti and their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation. The University of Arizona Press. Tucson. pp. 66-86.
- Tiagi, Y. D. 1954. Studies in the Floral Morphology of *Opuntia Dillenii* Haworth. 1. Development of the ovule and gametophytes. *Botaniska Notiser* 4: 343-356.

- Tiagi, Y. D. 1967. Contribution to the embryology of the genus *Pereskia*.
Proceedings 54th Indian Scientific Congress, Part III: Abstracts. Hyderabad.
pp. 324-325.
- Tobe, H. 1989. The embryology of angiosperms: its broad application to the
systematic and evolutionary study. *The Botanical Magazine, Tokio* 102: 351-
367.
- Tsukada, M. 1964. Pollen morphology and identification. II. Cactaceae. *Pollen et
Spores* 6(1): 45-84.
- Tucker, S. C. y A. W. Douglas. 1993. Utility of ontogenetic and conventional
characters in determining phylogenetic relationships of Saururaceae and
Piperaceae (Piperales). *Systematic Botany* 18(4): 614-641.
- Valiente-Banuet, A., A. Rojas-Martínez, M. C. Arizmendi y P. Dávila. 1997.
Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and
Neobuxbaumia macrocephala) in the Tehuacan Valley, Central Mexico.
American Journal of Botany 84: 452-455.

CAPÍTULO II

Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae)

Citlali Núñez-Mariel¹, E. Mark Engleman² y Judith Márquez-Guzmán¹

Publicado en el Boletín de la Sociedad Botánica de México (2001) 68: 5-13

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-356, Ciudad Universitaria, D. F., México. e-mail: cnm@hp.fciencias.unam.mx

² Colegio de Postgraduados, Montecillo, 56230 Estado de México, México.

EMBRIOLOGÍA DE *PACHYCEREUS MILITARIS* (AUDOT) HUNT (CACTACEAE)

CITLALI NÚÑEZ-MARIEL¹, E. MARK ENGLEMAN² Y JUDITH MÁRQUEZ-GUZMÁN¹

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-356, Ciudad Universitaria, 04510 México, D. F. México. e-mail: cnm@hp.ciencias.unam.mx

²Colegio de Postgraduados, Montecillo, 56230 Estado de México, México

Resumen. Este trabajo es una contribución al conocimiento de la embriología de las cactáceas y a la definición de sus estructuras reproductoras. Se describe el desarrollo de anteras, óvulos y semillas de *Pachycereus militaris*. El desarrollo de la pared de la antera es monocotiledóneo. Este podría ser un carácter con valor taxonómico a nivel suprafamiliar. El endotecio está formado por un estrato y el polen es tricolpado, equinulado y punctitegilado. Se observó una tríada lineal de megasporas. La megaspóra funcional es la calazal. Se propone que el término campilótropo se use para describir el tipo de óvulo y el de circinótropo para el funículo. Contrariamente a lo sostenido por otros autores, se plantea que las semillas de *Pachycereus militaris* deben considerarse como no albuminosas y no perispermicas.

Palabras clave: *Pachycereus*, *Backebergia*, antera, óvulo, semilla, Cactaceae.

Abstract. This is a contribution to the embryology of cacti and to the definition of their reproductory structures. The development of anthers, ovules and seeds of *Pachycereus militaris* is described. The type of development of the anther wall is monocotyledonous. This may have taxonomic importance above the family level. The endothecium is formed by a single stratum and the pollen grains are tricolpate, spinulate and punctitegillate. A lineal triad of megasporas was observed. The functional megaspore is the chalazal one. It is proposed that the term campylotropous should be utilized for describing the ovule type, while the term circinotropous should be reserved for the funicle. In contrast to the stated by other authors, this study suggests that the seeds of *Pachycereus militaris* should be considered as non-albuminous and non-perispermous.

Key words: *Pachycereus*, *Backebergia*, anther, ovule, seed, Cactaceae.

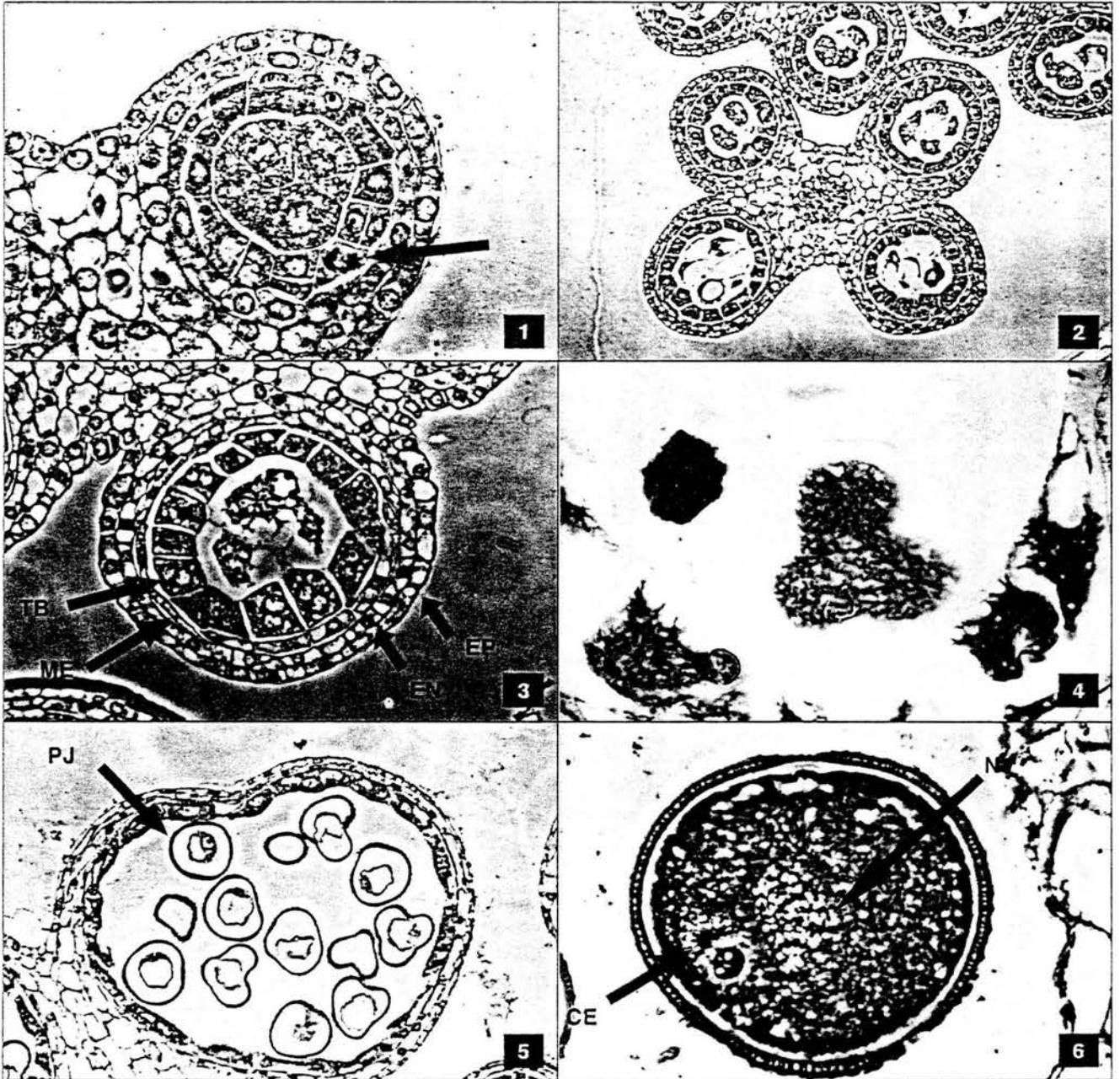
P*Pachycereus militaris* (Audot) Hunt es una cactácea arborescente que se caracteriza por la presencia de un cefalio, con cerdas en tonos de amarillo a café oscuro, que se encuentra en el ápice de las ramas maduras. Esta especie es endémica de México y se distribuye en la Cuenca del Río Balsas. Es considerada especie rara de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994; SEDESOL, 1994) y especie amenazada por la *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (Hunt, 1999). Esto es debido, posiblemente, a la reducción de sus hábitats por cambios en el uso del suelo, en particular por las actividades pecuarias y la expansión de la frontera agrícola. Observaciones preliminares de algunas poblaciones naturales, realizadas por Gibson *et al.* (1999), sugieren que éstas podrían también estar declinando debido a problemas de plagas.

La posición taxonómica de esta planta no ha sido esclarecida completamente hasta la fecha. Bravo-Hollis (1978) considera que es un género monotípico y que el nombre correcto para la especie es *Backebergia militaris* (Audot) Bravo ex Sánchez Mejorada, aclarando la confusión creada por Britton y Rose (1919-1923) quienes creyeron que se trataba de *Pachycereus fulviceps* (Lemaire) Hunt. Sin embargo, Hunt (1999) considera que *Backebergia militaris* es sinónimo de *Pachycereus militaris*.

Como ha sido señalado por Cronquist (1988) y Stuessy (1990), el uso de caracteres embriológicos puede ser muy importante para resolver problemas taxonómicos a diferentes niveles de la jerarquía en angiospermas. La presente investigación forma parte de un estudio comparativo del desarrollo de estructuras reproductoras de cinco especies de la tribu Pachycereeae (*Pachycereus militaris* (Audot) Hunt,

Pachycereus gaumeri Britton & Rose, *Pachycereus fulviceps* (Lemaire) Hunt, *Pachycereus pringlei* (Watson) Britton & Rose y *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console), enfocado a la búsqueda de caracteres útiles para la delimitación del género *Pachycereus* y para la sistemática de la subfamilia.

La embriología de la familia Cactaceae no ha sido suficientemente estudiada. La mayoría de los trabajos se han enfocado a la descripción del desarrollo de óvulos y semillas (Guignard, 1886; Maheswhari y Chopra, 1955; Engleman, 1960; Hernández-García y García-Villanueva, 1991). Otros aspectos importantes, tales



Figuras 1-6. Cortes transversales de antera. 1. Microsporangio en donde se observa la división de la capa parietal interna (flecha) 272x. 2. Antera inmadura tetrasporangiada 64x. 3. Microsporangio con células madres de las microsporas rodeadas por el tapete binucleado (TB), capa media (ME), endotecio (EN) y epidermis (EP) 160x. 4. Tétrada tetraédrica de microsporas formada a partir de citocinesis simultánea 400x. 5. Microsporangio con granos de polen jóvenes (PJ) 100x. 6. Grano de polen maduro mostrando el núcleo de la célula vegetativa (NV) y las células espermáticas (CE) 400x.

como el desarrollo de las anteras, se encuentran poco documentados. Más aún, existen imprecisiones e inconsistencias en la forma como se definen y describen las diferentes estructuras. Este es el caso, por ejemplo, de la confusión que hay en la descripción de los diferentes tipos de óvulo o de funículo. Esto representa una limitación importante para la caracterización embriológica de la familia y puede conducir a descripciones incorrectas de los procesos de desarrollo de las estructuras reproductoras, así como a hipótesis filogenéticas erróneas.

El conocimiento integral de la embriología de las cactáceas debería partir de la definición precisa de las estructuras reproductoras. Por otra parte, una revisión de la embriología de esta familia debería sustentarse en el estudio sistemático de un conjunto de taxa representativos de las distintas subfamilias. *Pachycereus militaris* pertenece a la tribu Pachycereeae, que incluye a las cactáceas columnares o candelabroiformes, y que es, junto con las tribus Echinocereae y Cacteae, uno de los grupos de la familia mejor representados en México. Este trabajo es el primero de una serie de estudios para documentar la embriología de la tribu Pachycereeae.

Materiales y métodos.

Se recolectaron flores en anthesis, botones florales y frutos en distintas etapas de desarrollo en la población de *Pachycereus militaris* que se encuentra a 5 km al N de Buenavista Tomatlán, Municipio de Apatzingán, Michoacán (19° 15' 44" N, 102° 34' 60" W). La vegetación predominante es bosque tropical caducifolio. El ejemplar de herbario fue depositado en el MEXU (JE 4534).

El material recolectado se fijó en FAA (formaldehído-ácido acético-etanol) en el campo y posteriormente fue deshidratado con alcoholes graduales. Las muestras que fueron incluidas en Paraplast se cortaron a un grosor de 7 a 10 μm y se tiñeron con safranina y verde fijo. Las muestras que se incluyeron en plástico de JB-4 y LR White fueron cortadas con cuchillas de vidrio a un grosor de 1 μm y se tiñeron con azul de toluidina.

Se realizaron pruebas histoquímicas para detectar almidón (Lugol), taninos (vainillina-HCl; modificación de Waterman y Mole, 1994), polisacáridos insolubles y proteínas (ácido peryódico-reactivo de Schiff y azul negro de naftol; modificado de Clark, 1981).

Las semillas y el polen se observaron con microscopía electrónica de barrido. Las semillas maduras se lavaron utilizando ultrasonido y alcohol etílico al 96%. Posteriormente se colocaron en una cámara de vacío, se cubrieron con oro y se observaron en un micros-

copio electrónico de barrido en aumentos desde 35X hasta 500X. El polen se colocó directamente en portamuestras, se cubrió con oro y fue observado con aumentos de 500X a 1000X.

Resultados

Desarrollo de la pared de la antera. Los primordios de antera surgen del meristemo floral en secuencia centrífuga. Cada primordio de antera está formado por tejido meristemático rodeado por una protodermis uniestratificada. Algunas células arqueosporiales subepidérmicas se diferencian y se dividen periclinalmente dando lugar a las células parietales y a las células esporógenas.

La capa parietal se divide periclinalmente y origina dos capas parietales secundarias, una interna y una externa. La capa parietal secundaria externa forma directamente el endotecio. La capa parietal secundaria interna se divide periclinalmente y origina una capa media y el tapete (figura 1). La antera desde etapas tempranas de desarrollo es bilobulada, tetrasporangiada, presenta drusas en el conectivo y su pared está constituida por cuatro estratos: epidermis, endotecio, capa media y tapete (figuras 2 y 3). Dado que solamente se forma una capa media y ésta se origina de la capa parietal secundaria interna, se considera que el tipo de desarrollo de la pared de la antera es monocotiledóneo.

Antes de que inicie la primera división meiótica de las células esporógenas, las células del tapete han duplicado su tamaño y presentan dos núcleos (figura 3). La capa media comienza a constreñirse durante la segunda división meiótica, hasta llegar a desaparecer una vez que la antera alcanza su madurez.

En la etapa de granos de polen uninucleados, las células del tapete comienzan a degenerar, liberando su contenido hacia el lóculo de la antera. Parte del contenido se adhiere a las paredes de los granos de polen recién formados. Lo anterior, permite reconocer al tapete como uno de tipo secretor. Tanto la capa media como el tapete llegan a desaparecer cuando la antera alcanza su madurez.

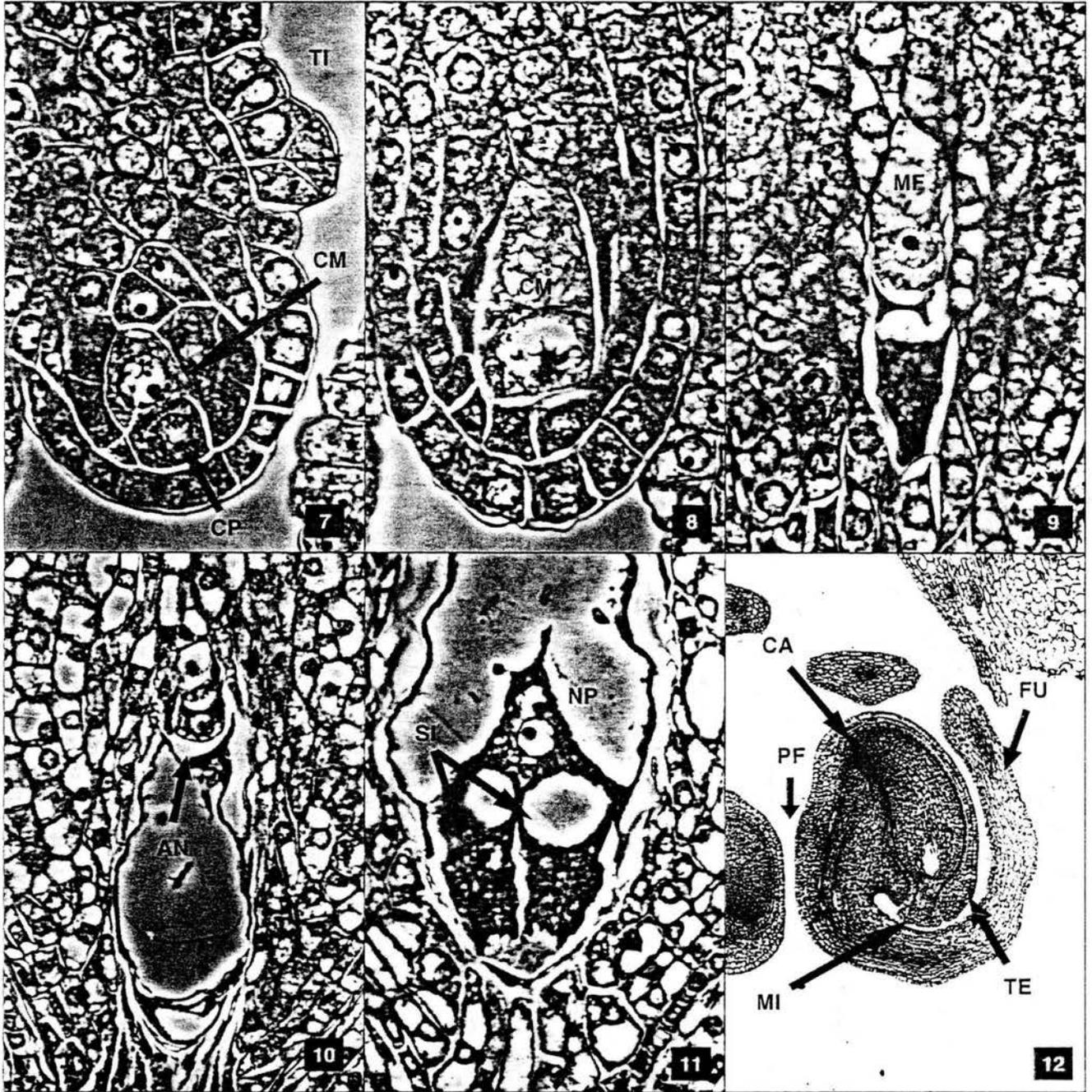
Después de la liberación de las microsporas de la tétrada, las células del endotecio aumentan su volumen y forman engrosamientos en las paredes anticlinales. En la anthesis, la pared de la antera está formada exclusivamente por la epidermis uniestratificada y el endotecio.

Microsporogénesis y microgametogénesis. Las células esporógenas aumentan en número por sucesivas divisiones mitóticas e incrementan su tamaño convirtiéndose en células madres de las microsporas. Antes de iniciar la meiosis, cada célula madre de las microsporas se rodea por una gruesa pared de calosa, pero se obser-

van canales citoplásmicos atravesando estas paredes y conectando las células entre sí.

La tétrada de microsporas se origina a partir de un proceso de citocinesis simultánea. La primera

división meiótica de las células madres de las microsporas no es seguida por la formación de paredes, por lo que se forma una célula binucleada, la cual continúa con la segunda división meiótica y tiene como



Figuras 7-12. Cortes longitudinales de óvulo. 7. Primordio de óvulo en donde se observa la célula madre de las megasporas (CM), célula parietal (CP) y la formación del tegumento interno (IT) 64x. 8. Óvulo crasinucleado con células madres de las megasporas (CM) 400x. 9. Megaspora funcional calazal (MF) 400x. 10. Megagametofito con células antípodas (AN) 204.8x. 11. Megagametofitos con núcleos polares (NP) y sinérgidas (SI) 256x. 12. Óvulos en preantesis; funículo (EU), micrópilo (MI), cálaza (CA), tegumento externo (TE), protuberancia funicular (PF) 25.2x.

producto una célula con cuatro núcleos haploides (figura 4). Es hasta este momento, cuando se forman las paredes de calosa que van a separar a las cuatro microsporas. La tétrada que se origina a partir de este proceso es de tipo tetraédrico.

Cuando se degrada la pared de calosa se liberan las microsporas y cada una de ellas da lugar a un grano de polen unicelular. Estos granos de polen presentan un citoplasma altamente vacuolado, núcleo excéntrico y una capa de exina muy delgada, pero ya con ornamentaciones (figura 5).

Los granos de polen jóvenes se dividen mitóticamente, originando una célula vegetativa y una célula generatriz. Esta última, se divide nuevamente y forma dos células espermáticas, por lo que el polen antes del momento de ser liberado es tricelular (figura 6).

Las anteras son dehiscentes desde antes de la antesis. Los granos de polen maduros son esferoidales, tricolpados, punctitegilados, equinulados y presentan un citoplasma sumamente denso con abundantes proteínas.

Desarrollo del óvulo. A partir de la pared interna del ovario surgen los primordios de óvulos, los cuales están formados por un tejido indiferenciado que da origen a la nucela y por una capa de células que forman la protodermis nucelar. Las células arquesporales se forman a partir de células en posición hipodérmica, estas células se distinguen porque son de mayor tamaño y presentan núcleos muy evidentes. Cada célula arquesporial se divide periclinamente dando lugar a una célula parietal en posición hipodérmica y a una célula madre de las megasporas, en la parte más interna (figura 7).

Los tegumentos del óvulo inician su formación como pequeñas protuberancias que surgen de la epidermis nucelar, por lo que se consideran de tipo dérmico. A partir de este momento, el primordio de óvulo empieza a curvarse y la célula madre de las megasporas comienza a prepararse para la meiosis, aumenta significativamente de tamaño, adquiere forma alargada y su citoplasma se hace cada vez más vacuolado (figura 8).

La curvatura del óvulo se debe principalmente al crecimiento asimétrico de los tegumentos, hay un mayor número de divisiones anticlinales en la parte dorsal que en la ventral, lo que origina que el óvulo comience a curvarse desde el inicio de su formación.

La célula madre de las megasporas se divide meióticamente y forma una tríada de megasporas, aparentemente, debido a que no hay citocinesis en la díada micropilar. La megaspóra funcional calazal da lugar al megagametofito y las megasporas restantes degeneran (figura 9). En este momento, la nucela está

totalmente cubierta por los tegumentos y el óvulo se ha curvado tanto que la región micropilar del óvulo se encuentra en una posición cercana al funículo. La megaspóra funcional aumenta de tamaño y su núcleo se divide mitóticamente hasta formar un saco embrionario octanucleado de tipo *Polygonum*.

Las células antípodas son efímeras, sólo pueden ser observadas en etapas muy tempranas de la formación del saco embrionario (figura 10). En los botones florales en preantesis, las antípodas ya han degenerado y el megagametofito está formado exclusivamente por una célula central binucleada, la ovocélula y dos células sinérgidas. Los núcleos polares están rodeados por granos de almidón, cada sinérgida presenta un citoplasma sumamente denso, una gran vacuola en la región calazal, un núcleo hacia la región micropilar y un aparato filiforme muy evidente (figura 11).

Tipo de óvulo. Los óvulos maduros son campilótropos, bitégmicos y crasinucelados (figura 12). Los tegumentos son biestratificados con excepción de la región micropilar, en donde aumenta el número de estratos. Entre ambos tegumentos se encuentra un espacio aéreo en la región más cercana a la cálaza. El haz vascular que proviene del funículo llega hasta la cálaza. El micrópilo está formado por el tegumento interno.

A la altura de la zona donde el tegumento externo se fusiona con el funículo se encuentra un ensanchamiento que, de acuerdo con Engleman (1960), recibe el nombre de protuberancia funicular. El funículo es ramificado, circinótrofo y presenta papilas en su parte ventral, lo que podría contribuir a la conducción del tubo polínico ya que la fecundación es porógama.

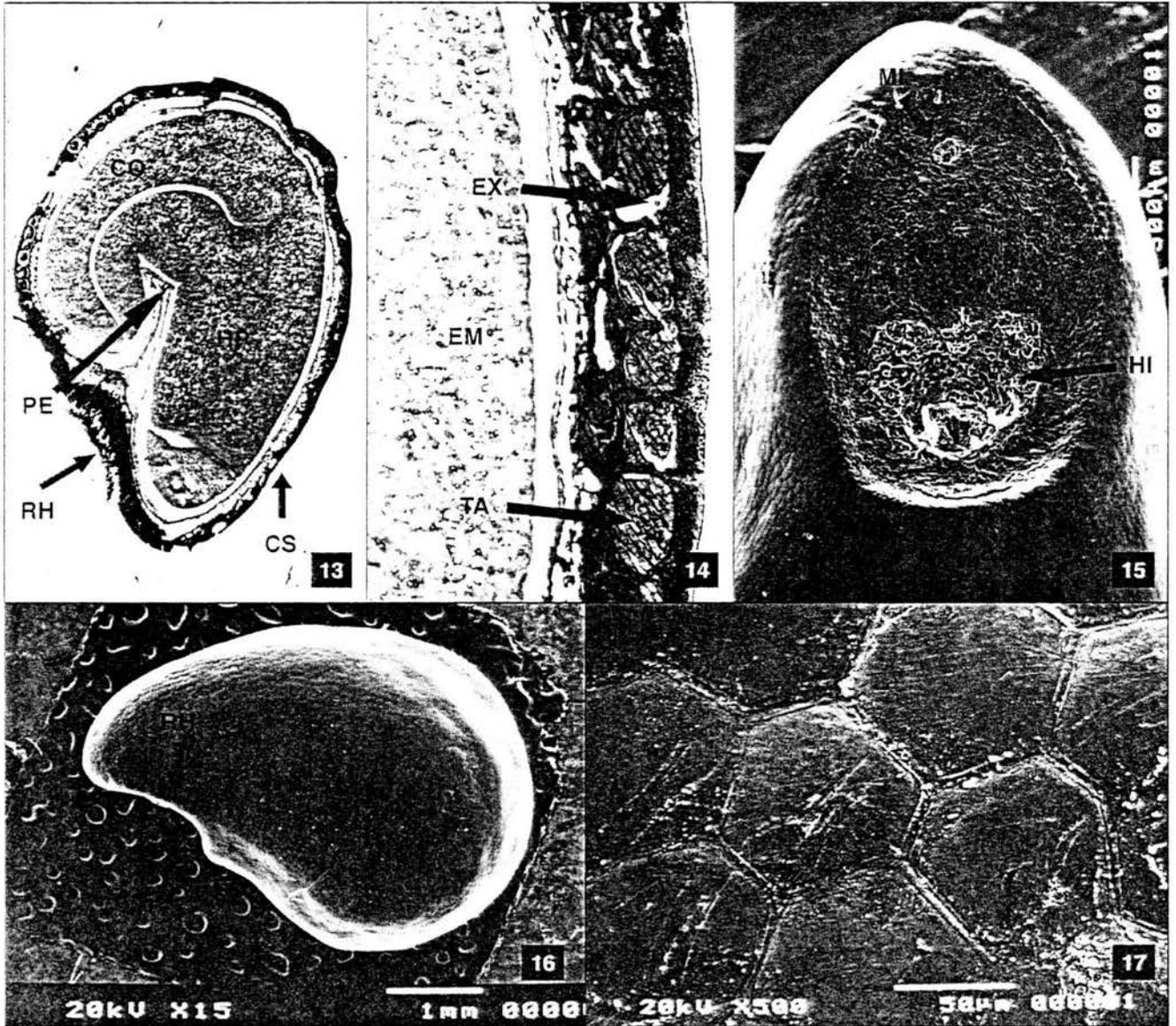
Embriogénesis. Como producto de la primera división del cigoto se forma una célula basal de mucho mayor tamaño que la célula apical. Después de subsecuentes divisiones se forma un proembrión columnar con células basales de mayor tamaño que las apicales y con presencia de numerosas vacuolas.

A partir del proembrión columnar se forma un embrión globular con un suspensor claramente definido. Las células apicales del proembrión columnar dan lugar al embrión propiamente y las células basales al suspensor, el cual se mantiene hasta etapas posteriores. No se observó poliembrión.

El embrión globular desarrolla los primordios de los cotiledones convirtiéndose en un embrión con forma de corazón. El embrión continúa creciendo hasta alcanzar la etapa de torpedo. Cuando el embrión llega a ocupar tres cuartas partes del largo de la semilla, los cotiledones comienzan a curvarse.

El embrión maduro ocupa prácticamente todo el volumen de la semilla. La curvatura del embrión sigue la curvatura de la nucela. El hipocótilo es succulento y lo recorre un cilindro vascular incipiente desde la radícula hasta el meristemo apical que se encuentra entre los cotiledones (figura 13). En esta etapa, el endospermo y la nucela se han degradado casi completamente y las reservas, compuestas principalmente de proteínas y lípidos, se encuentran en el embrión.

Endospermogénesis. Los núcleos polares se fusionan antes de la fecundación. El núcleo primario del endospermo, producto de la fusión de los núcleos polares con uno de los núcleos espermáticos del tubo polínico, se divide consecutivamente sin que haya cariocinesis hasta constituir una cadena de núcleos unidos por citoplasma. Esta condición libre nuclear del endospermo, se mantiene desde las primeras divisiones del cigoto hasta las etapas más tempranas del embrión globular. El endospermo es de tipo nuclear.



Figuras 13-14. Cortes longitudinales de semilla. 13. Semilla madura: cotiledón (CO), cubierta seminal (CS), hipocótilo (HP), perispermo (PE), región hilo-micropilar (RH) 2x. 14. Detalle de la cubierta seminal: embrión (EM), exotesta (EX), taninos (TA) 40x. Figs. 15-17. Observaciones con microscopía electrónica de barrido. 15. Región hilo-micropilar: micrópilo (MI), hilo (HI). 16. Micromorfología de semilla madura; región hilo-micropilar (RH). 17. Detalle de la testa.

Cuando el embrión globular aumenta de volumen, comienza a haber citocinesis en el endospermo que se encuentra a su alrededor; pero en la región calazal del saco embrionario, continúa siendo libre nuclear, con citoplasma muy denso y núcleos hipertrofiados. El endospermo en la región calazal aparentemente va digiriendo a la nucela conforme avanza el desarrollo de la semilla, lo que sugiere una posible función haustorial.

En la etapa de corazón del embrión, el endospermo está formado por células con numerosas vacuolas y paredes delgadas que cubren el espacio que anteriormente tenía la nucela. En el momento en que el embrión llega aproximadamente a la mitad de su desarrollo se completa la citocinesis del endospermo.

Conforme avanza el crecimiento del embrión, la nucela y el endospermo van siendo consumidos paulatinamente, hasta que en la madurez de la semilla, el endospermo consiste de un solo estrato que cubre la radícula del embrión y se extiende hasta rodear el hipocótilo. Los restos de la nucela ocupan solamente una pequeña área ubicada en la parte cóncava del embrión, entre los cotiledones y el hipocótilo, la cual, por la presencia de almidón, es considerada como perispermo.

Desarrollo de la cubierta seminal. Se depositan numerosos gránulos de taninos en una gran vacuola en las células de la exotesta y del endotegmen. Esta vacuola, conforme madura la semilla, aumenta de tamaño y desplaza el núcleo hacia la periferia, llegando a ocupar la totalidad del volumen celular.

En forma paralela al proceso anterior, las células de la exotesta aumentan de tamaño, adquieren forma alargada y engruesan sus paredes periclinales, mientras que las células del endotegmen se aplanan, quedando cada vez más comprimidas. Las paredes periclinales externas de la exotesta pueden llegar a medir hasta 70 μm y las paredes periclinales internas, hasta 18 μm , el resto del espacio celular está ocupado exclusivamente por taninos. En la semilla madura, las células de la exotesta constituyen la principal capa mecánica (figura 14).

Las observaciones realizadas con microscopía electrónica de barrido muestran que el micrópilo se encuentra dentro de la copa hilar (figura 15) y la superficie de las semillas maduras es lisa (figura 16). Las células de la exotesta presentan paredes periclinales externas planas con límites celulares rectos y forma hexagonal (figura 17).

Discusión

Aunque los resultados del presente trabajo concuerdan en lo general con la descripción de la embriolo-

gía de otras especies de la familia (Maheshwari y Chopra, 1955; Engleman, 1960; Kapil y Prakash, 1969; Tiagi, 1970; Flores y Engleman, 1976; Flores 1976; Johri *et al.* 1992), se observaron algunos procesos y características que no habían sido reportadas anteriormente o que habían sido insuficientemente documentadas. Algunas de estas características podrían tener valor taxonómico.

Davis (1966) y Johri *et al.* (1992) mencionan a las cactáceas como un ejemplo de las familias con desarrollo de la pared de la antera de tipo monocotiledóneo, pero no citan la fuente de información, ni incluyen este carácter en la descripción embriológica de la familia. En la literatura donde se aborda el desarrollo de la antera de esta familia (Kapil y Prakash, 1969; Tiagi, 1970), sólo se describen los procesos de microsporogénesis y microgametogénesis, sin considerar el desarrollo de la pared. En el caso de *Pachycereus militaris*, se encontró que la capa parietal secundaria externa se convierte directamente en el endotecio, y la capa parietal secundaria interna da origen a la capa media y al tapete, por lo que se considera que el desarrollo de la pared es de tipo monocotiledóneo. Esto confirma la afirmación que Davis (1966) y Johri *et al.* (1992) hacen al respecto.

Davis (1966) sostiene que el desarrollo de tipo monocotiledóneo ha sido observado típicamente en monocotiledóneas, sin embargo, no es exclusivo de ese grupo. Este tipo de desarrollo de la pared de la antera también puede encontrarse en otras familias de dicotiledóneas tales como Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Portulacaceae y Molluginaceae, todas pertenecientes al mismo orden que las cactáceas (Caryophyllales). Lo anterior sugiere que el desarrollo de la pared de la antera podría ser un carácter con valor taxonómico a nivel suprafamiliar.

Kapil y Prakash (1969) encontraron que *Cereus jamacaru* De Candolle, una cactácea sudamericana de hábito similar al de *Pachycereus militaris*, presenta tétradas de microsporas tetraédricas y decusadas, endotecio con dos o tres estratos en la vecindad del conectivo y epidermis de la antera dehiscente con taninos. En *Pachycereus militaris*, solamente se observaron tétradas tetraédricas, el endotecio está formado por un estrato y la epidermis de la antera no presenta taninos.

La presencia de una tríada lineal de megasporas en *Pachycereus militaris* apoya las observaciones hechas para otras cactáceas, tales como *Opuntia dilenii* (Ker-Gawler) Haworth, *Astrophytum myriostigma* Lemaire y *Cereus jamacaru* en las que también se observaron tríadas (Maheshwari y Chopra, 1955; Engleman, 1960; Kapil y Prakash, 1969), sin embargo, algunos autores mencionan además, la presencia de tétradas (Ka-

Cuando el embrión globular aumenta de volumen, comienza a haber citocinesis en el endospermo que se encuentra a su alrededor; pero en la región calazal del saco embrionario, continúa siendo libre nuclear, con citoplasma muy denso y núcleos hipertrofiados. El endospermo en la región calazal aparentemente va digiriendo a la nucela conforme avanza el desarrollo de la semilla, lo que sugiere una posible función haustorial.

En la etapa de corazón del embrión, el endospermo está formado por células con numerosas vacuolas y paredes delgadas que cubren el espacio que anteriormente tenía la nucela. En el momento en que el embrión llega aproximadamente a la mitad de su desarrollo se completa la citocinesis del endospermo.

Conforme avanza el crecimiento del embrión, la nucela y el endospermo van siendo consumidos paulatinamente, hasta que en la madurez de la semilla, el endospermo consiste de un solo estrato que cubre la radícula del embrión y se extiende hasta rodear el hipocótilo. Los restos de la nucela ocupan solamente una pequeña área ubicada en la parte cóncava del embrión, entre los cotiledones y el hipocótilo, la cual, por la presencia de almidón, es considerada como perispermo.

Desarrollo de la cubierta seminal. Se depositan numerosos gránulos de taninos en una gran vacuola en las células de la exotesta y del endotegmen. Esta vacuola, conforme madura la semilla, aumenta de tamaño y desplaza el núcleo hacia la periferia, llegando a ocupar la totalidad del volumen celular.

En forma paralela al proceso anterior, las células de la exotesta aumentan de tamaño, adquieren forma alargada y engruesan sus paredes periclinales, mientras que las células del endotegmen se aplanan, quedando cada vez más comprimidas. Las paredes periclinales externas de la exotesta pueden llegar a medir hasta 70 μm y las paredes periclinales internas, hasta 18 μm , el resto del espacio celular está ocupado exclusivamente por taninos. En la semilla madura, las células de la exotesta constituyen la principal capa mecánica (figura 14).

Las observaciones realizadas con microscopía electrónica de barrido muestran que el micrópilo se encuentra dentro de la copa hilar (figura 15) y la superficie de las semillas maduras es lisa (figura 16). Las células de la exotesta presentan paredes periclinales externas planas con límites celulares rectos y forma hexagonal (figura 17).

Discusión

Aunque los resultados del presente trabajo concuerdan en lo general con la descripción de la embriolo-

gía de otras especies de la familia (Maheshwari y Chopra, 1955; Engleman, 1960; Kapil y Prakash, 1969; Tiagi, 1970; Flores y Engleman, 1976; Flores 1976; Johri *et al.* 1992), se observaron algunos procesos y características que no habían sido reportadas anteriormente o que habían sido insuficientemente documentadas. Algunas de estas características podrían tener valor taxonómico.

Davis (1966) y Johri *et al.* (1992) mencionan a las cactáceas como un ejemplo de las familias con desarrollo de la pared de la antera de tipo monocotiledóneo, pero no citan la fuente de información, ni incluyen este carácter en la descripción embriológica de la familia. En la literatura donde se aborda el desarrollo de la antera de esta familia (Kapil y Prakash, 1969; Tiagi, 1970), sólo se describen los procesos de microsporogénesis y microgametogénesis, sin considerar el desarrollo de la pared. En el caso de *Pachycereus militaris*, se encontró que la capa parietal secundaria externa se convierte directamente en el endotecio, y la capa parietal secundaria interna da origen a la capa media y al tapete, por lo que se considera que el desarrollo de la pared es de tipo monocotiledóneo. Esto confirma la afirmación que Davis (1966) y Johri *et al.* (1992) hacen al respecto.

Davis (1966) sostiene que el desarrollo de tipo monocotiledóneo ha sido observado típicamente en monocotiledóneas, sin embargo, no es exclusivo de ese grupo. Este tipo de desarrollo de la pared de la antera también puede encontrarse en otras familias de dicotiledóneas tales como *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Portulacaceae* y *Molluginaceae*, todas pertenecientes al mismo orden que las cactáceas (*Caryophyllales*). Lo anterior sugiere que el desarrollo de la pared de la antera podría ser un carácter con valor taxonómico a nivel suprafamiliar.

Kapil y Prakash (1969) encontraron que *Cereus jamacaru* De Candolle, una cactácea sudamericana de hábito similar al de *Pachycereus militaris*, presenta tétradas de microsporas tetraédricas y decusadas, endotecio con dos o tres estratos en la vecindad del conectivo y epidermis de la antera dehiscente con taninos. En *Pachycereus militaris*, solamente se observaron tétradas tetraédricas, el endotecio está formado por un estrato y la epidermis de la antera no presenta taninos.

La presencia de una tríada lineal de megasporas en *Pachycereus militaris* apoya las observaciones hechas para otras cactáceas, tales como *Opuntia dilenii* (Ker-Gawler) Haworth, *Astrophytum myriostigma* Lemaire y *Cereus jamacaru* en las que también se observaron tríadas (Maheshwari y Chopra, 1955; Engleman, 1960; Kapil y Prakash, 1969), sin embargo, algunos autores mencionan además, la presencia de tétradas (Ka-

pil y Prakash, 1969; Tiagi, 1970). Según Davis (1966), la presencia de una tríada de megasporas en lugar de una tétrada en esta familia, es debida probablemente a la supresión de la segunda división meiótica en la célula micropilar de la díada resultante de la primera división meiótica, aunque se requieren estudios más detallados para clarificar este punto.

Hasta el momento no existe acuerdo entre los autores con respecto al tipo de óvulo en cactáceas. Davis (1966) señala que son circinótropos. Tiagi (1970) sostiene que pueden ser campilótropos, circinótropos o hemicircinótropos, dependiendo del género. Johri *et al.* (1992) mencionan que los óvulos en esta familia pueden ser anátropos, hemianátropos, campilótropos o circinótropos. En el caso de *Pachycereus militaris*, consideramos que los óvulos son de tipo campilótropo debido a la curvatura de la nucela y el término circinótropo lo reservamos para el funículo, puesto que éste rodea al óvulo.

Tradicionalmente, las semillas de la familia Cactaceae se han considerado como albuminosas y perispermicas (Davis, 1966; Tiagi, 1970; Johri *et al.*, 1992), es decir, que en la semilla madura se encuentra endospermo y perispermo como tejidos de reserva, sin embargo, en las semillas maduras de *Pachycereus militaris* la presencia de ambos tejidos es mínima. Esto es debido a que el embrión durante su desarrollo, consume casi la totalidad del endospermo y del perispermo. En la madurez, el embrión ocupa prácticamente todo el volumen de la semilla, el perispermo está reducido a una pequeña franja en la región cóncava del embrión y el endospermo está formado por un solo estrato de células que rodea a la radícula y al hipocótilo. Debido a lo anterior, las semillas maduras de esta especie, deben considerarse como no albuminosas y no perispermicas.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 3666P-N) y por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradecemos al Dr. Javier Caballero por la cuidadosa revisión del manuscrito y su apoyo en el trabajo de campo. A la M. en C. Silvia Espinosa por la realización de las fotografías de microscopía electrónica de barrido y por su asistencia técnica. Al M. en C. Alejandro Martínez por la realización de las fotomicrografías. A la Dra. Sonia Vásquez por sus valiosos comentarios. A la M. en C. Margarita Ponce por sus sugerencias para las pruebas histoquímicas. Al Biól. Jerónimo Reyes y la Biól. Araceli de la Rosa por su ayuda en el trabajo de campo y la elaboración de ejemplares de herbario.

Literatura citada

- Bravo-Hollis H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol I. UNAM. México. 743 pp.
- Britton N. L. y Rose J. N. 1919-1923. *The Cactaceae*. 4 Vols. The Carnegie Institution of Washington. Washington, D.C. 318 pp.
- Clark G. (Ed.) 1981. *Staining Procedures*. Williams & Wilkins. Baltimore. p. 323
- Cronquist A. 1988. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden. USA. 555 pp.
- Davis G. L. 1966. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 528 pp.
- Engleman E. M. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. *American Journal of Botany* 47: 460-467.
- Flores E. M. y Engleman E. M. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. I Desarrollo y estructura. *Revista de Biología Tropical* 24: 199-227.
- Flores E. M. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. II Caracteres de valor taxonómico. *Revista de Biología Tropical* 24: 299-321.
- Gibson A. C., Armella M. A., Etges W., Ramos C. y Sandoval E. 1999. Depredación de semillas de *Backebergia militaris* y las implicaciones en su conservación. En: *Resúmenes del II Congreso Mexicano de Cactáceas y otras Plantas Suculentas*. México. p. 94.
- Guignard M. L. 1886. Observations sur les ovules et la fécondation des cactées. *Bulletin de la Société Botanique de France* 33: 276-280.
- Hernández-García G. y García-Villanueva E. 1991. Anatomía comparada de óvulos y semillas de dos especies del género *Mammillaria* (Cactaceae) *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 51:25-38.
- Hunt D. (Comp.). 1999. *CITES Cactaceae Checklist*. Royal Botanic Gardens Kew & International Organization for Succulent Plant Study. London. 315 pp.
- Johri B. M., Ambegaokar y Srivastava P. S. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*. Vol. I. Springer-Verlag. New York. 614 pp.
- Kapil R. N. y Prakash N. 1969. Embryology of *Cereus jamacaru* and *Ferocactus wislizeni* and comments on the systematic position of the Cactaceae. *Botaniska Notiser* 122: 409-426
- Maheswari P. y Chopra R.N. 1955. The structure and development of the ovule and seed of *Opuntia dillenii* Haw. *Phytomorphology* 5: 112-122.
- SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social). 1994. Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994). Diario Oficial de la Federación del 16 de mayo de 1994. Tomo CDLXXXVIII. No.10 p. 9.
- Stuessy T. F. 1990. *Plant Taxonomy The Systematic Evaluation of Comparative Data*. Columbia University Press. New York. 251-266.
- Tiagi Y. D. 1970. Cactaceae. En: Seshachar B. R. Ed. Pro-

ceedings of the Symposium on Comparative Embriology of Angiosperms. *Bulletin of the Indian National Science Academy* 41: 30-35.

Waterman P.G. y Mole S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 95-100.

CAPÍTULO III

Estudio embriológico comparativo de cinco especies de la tribu Pachycereeae

Resumen

Se describe el desarrollo de anteras, óvulos y semillas de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*. El tipo de desarrollo de la pared de la antera es monocotiledóneo en las cinco especies. La epidermis de las anteras de *M. geometrizans* presenta taninos. Los óvulos de las cinco especies son campilótropos y las semillas maduras son no albuminosas y no perispérmicas. Se presentan datos comparativos de la anatomía y micromorfología de óvulos y semillas. Se realizó el análisis de 22 caracteres por medio de métodos cuantitativos. Los caracteres de utilidad taxonómica en las especies estudiadas son aquellos que describen la anatomía y micromorfología de óvulos y semillas.

Introducción

La tribu Pachycereeae incluye a la mayoría de los grandes cactus columnares con distribución predominantemente mexicana (Bravo-Hollis, 1978; Barthlott y Hunt, 1993). Tomando en cuenta la morfología de flores, frutos y semillas, Buxbaum (1961) dividió a la tribu Pachycereeae en cinco subtribus (Cephalocereinae, Myrtillocactinae, Pachycereinae, Pterocereinae y Stenocereinae). Posteriormente, Gibson y Horak (1978) y Gibson *et al.* (1986), basándose en caracteres morfológicos, anatómicos y fitoquímicos, dividieron a la tribu en dos subtribus: Stenocereinae y Pachycereinae. Cornejo y Simpson (1997) apoyan esta última hipótesis, aunque no especifican los caracteres utilizados en su análisis. A partir de datos anatómicos y morfológicos, Terrazas y Loza-Cornejo (2002) realizaron el análisis filogenético de la tribu Pachycereeae y encontraron que *Stenocereus* forma un clado monofilético, al igual que el grupo formado por *Escontria*, *Polaskia* y *Myrtillocactus*, pero no apoya la monofilia de *Pachycereus sensu* Barthlott y Hunt (1993), ya que *Pachycereus fulviceps* (Lem.) D. R. Hunt parece estar más relacionado con *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia* y *Carnegiea*.

La delimitación genérica dentro de Pachycereeae no ha sido claramente definida. En particular, la circunscripción del género *Pachycereus* ha sido controvertida. El número de especies en este género es muy variable en los distintos tratamientos taxonómicos, 11 para Britton y Rose (1920), 4 para Bravo-Hollis (1978), 6 para

Gibson y Horak (1978) y 12 para Hunt (1999). La presencia de escamas, espinas, cerdas o tricomas en flores y frutos fueron las características propuestas por Britton y Rose (1920) para identificar las especies de *Pachycereus*, aunque estas estructuras pueden estar presentes en otros géneros de la misma tribu. Antes del análisis cladístico de Arias (2002) no se conocía ninguna sinapomorfia que delimitara a *Pachycereus*. Este autor, utilizando caracteres morfológicos y moleculares, concluye que el género está formado solamente por *Pachycereus grandis* Rose, *P. pecten-aboriginum* (Engelm.) Britton & Rose, *P. pringlei* (S. Watson) Britton & Rose, *P. tepamo* S. Gama & S. Arias y *P. weberi* (J. M. Coult.) Backeb. De acuerdo con los resultados obtenidos por Arias (2002), estas especies forman un grupo monofilético definido por la forma de la flor de tipo G (pericarpelo amplio, constricción del tubo receptacular tenue y tubo receptacular ligeramente abierto) y la presencia de un surco interareolar.

El valor en sistemática de los caracteres embriológicos ha sido sostenido por autores como Palser (1975), Herr (1984), Tobe (1989), Tsou, (1997), Rudall *et al.* (1998) y González *et al.* (2001), quienes han probado su utilidad en la resolución de problemas taxonómicos, proponiendo más de cincuenta caracteres con valor potencial en la circunscripción de taxa con distintos niveles jerárquicos.

La caracterización embriológica de la familia Cactaceae todavía no ha sido claramente establecida, aun cuando existen antecedentes que describen el desarrollo de las estructuras reproductoras en esta familia (Guignard, 1886;

Archibald, 1939; Banerji y Sen, 1954; Tiagi, 1954, 1967, 1970; Maheshwari y Chopra, 1955; Chopra, 1957; Johri *et al.*, 1992). Más aún, la mayoría de las investigaciones son parciales, muchos grupos taxonómicamente representativos de la subfamilia Cactoideae no han sido considerados, además, es frecuente encontrar inconsistencias en las descripciones y la mayoría de los trabajos carecen de documentación fotográfica.

Entre los antecedentes de estudios comparativos con caracteres embriológicos se encuentran el realizado por Engleman (1960), quien describe el desarrollo de óvulos y semillas en *Astrophytum myriostigma* Lem., *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose y *Toumeyia papyracantha* (Engelm.) Britton & Rose. Kapil y Prakash (1969) realizaron el estudio embriológico de *Cereus jamacaru* DC. y *Ferocactus wislizeni* (Engelm.) Britton & Rose. Flores (1976) y Flores y Engleman (1976) analizan caracteres morfológicos y anatómicos de óvulos y semillas maduros de especies pertenecientes a las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae (tribus Echinocereeae, Hylocereeae, Rhipsalideae y Pachycereeae). Taylor y Clark (1983) estudian la micromorfología de las semillas del género *Ferocactus* subg. *Ferocactus*, así como Friedrich y Glaetzle (1983), la micromorfología del género *Echinopsis*. Hernández-García y García-Villanueva (1991) comparan la anatomía de óvulos y semillas de *Mammillaria rhodantha* Link & Otto y *M. compressa* DC. Bregman (1992) analizó la morfología externa e interna de las semillas en algunos géneros de la subtribu Borzicactinae. Barthlott y Hunt (2000) describen la micromorfología de las semillas de numerosas especies

representativas de la subfamilia Cactoideae.

El propósito de la presente investigación fue realizar un estudio embriológico comparativo enfocado a la búsqueda de caracteres de utilidad taxonómica en la tribu Pachycereeae y que sienten los fundamentos estructurales de la biología reproductora en las especies *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri* Britton & Rose, *P. militaris* (Audot) D. R. Hunt, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans* (Mart.) Console.

En un trabajo reciente, Núñez-Mariel *et al.* (2001) describieron el desarrollo de la antera, óvulo y semilla de *P. militaris* y discutieron la importancia de precisar algunos términos que definen las estructuras reproductoras en cactáceas. Esta especie está catalogada como rara por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994) e incluida en el Apéndice I de la CITES (Hunt, 1999).

De acuerdo con Gibson y Horak (1978) y Gibson *et al.* (1986), *Pachycereus fulviceps* (*Mitrocereus fulviceps*), *P. gaumeri* (*Pterocereus gaumeri*) y *P. militaris* (*Backebergia militaris*) son géneros monotípicos pertenecientes a la subtribu Pachycereinae (*sensu* Gibson y Horak, 1978). Barthlott y Hunt (1993) y Hunt (1999), al realizar el sistema de clasificación más reciente para el grupo, retoman la propuesta taxonómica inicial de Britton y Rose (1920) e incluyen nuevamente estas especies en *Pachycereus* (Cuadro 1). Posteriormente, Anderson (2001)

Cuadro 1. Ubicación de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* en los distintos sistemas de clasificación.

Britton y Rose (1920)	Buxbaum (1961, 1963)	Bravo-Hollis (1978)	Gibson y Horak (1978)	Barthlott y Hunt (1993)	Anderson (2001)
<i>Pachycereus chrysomallus</i> (Lem.) Britton & Rose	<i>Mitrocereus militaris</i> (Audot) Bravo	<i>Backebergia militaris</i> (Audot) Bravo ex Sánchez-Mej.	<i>Backebergia militaris</i>	<i>Pachycereus militaris</i> (Audot) D. R. Hunt	<i>Pachycereus militaris</i>
	<i>Pseudomitrocereus fulviceps</i> (F.A.C. Weber) Bravo & Buxb.	<i>Mitrocereus fulviceps</i> (F.A.C. Weber ex K. Shum.) Backeb. ex Bravo	<i>Mitrocereus fulviceps</i>	<i>Pachycereus fulviceps</i> (Lem.) D. R. Hunt	<i>Pachycereus fulviceps</i>
<i>Pachycereus gaumeri</i> Britton & Rose	<i>Pterocereus gaumeri</i> (Britton & Rose) MacDoug. & Miranda	<i>Pterocereus gaumeri</i>	<i>Pterocereus gaumeri</i>	<i>Pachycereus gaumeri</i>	<i>Pachycereus gaumeri</i>
<i>Pachycereus pringlei</i> (S. Watson) Britton & Rose	<i>Pachycereus pringlei</i>	<i>Pachycereus pringlei</i>	<i>Pachycereus pringlei</i>	<i>Pachycereus pringlei</i>	<i>Pachycereus pringlei</i>

adopta la clasificación de Barthlott y Hunt (1993) para este género. Por su parte, Arias (2002) sostiene que estas tres especies deben ser excluidas de *Pachycereus* y las considera géneros monotípicos. *Pachycereus pringlei* es la especie tipo del género. *Myrtillocactus geometrizans* es una especie que pertenece a la subtribu Stenocereinae (*sensu* Gibson y Horak, 1978) y es utilizada como grupo de referencia.

Materiales y métodos

Recolección

Se recolectaron en el campo, botones florales, flores y frutos en distintas etapas de desarrollo de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* (individuos hermafroditas) y *Myrtillocactus geometrizans* (Cuadro 2). Los ejemplares de herbario se encuentran depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU).

Técnicas histológicas

El material biológico recolectado se fijó en FAA (formaldehído 5% - ácido acético 5% - etanol 63% - agua), se deshidrató en una serie de etanoles graduales y se procesó para ser incluido en Paraplast, JB-4 y LR White, mediante las técnicas convencionales para cada uno. Los bloques de Paraplast fueron cortados con microtomo de rotación a un grosor de 7 a 10 μm y los bloques de JB-4 y LR White se cortaron con ultramicrotomo a un grosor de 1 a 2 μm . Los cortes obtenidos del

Cuadro 2. Localidades en donde se recolectaron botones florales, flores y frutos de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*

ESPECIE	LOCALIDAD	TIPO DE VEGETACION	ALTITUD (m.s.n.m.)	EJEMPLARES (MEXU)
<i>P. gaumeri</i>	Mpio. Río Lagartos, 9 km al O de Las Coloradas en el camino a Río Lagartos, Yucatán	Duna costera con matorral espinoso	0 - 5	Arias 1100
	Mpio. Telchac, 8 km al N de Telchac Puerto, Yucatán	Selva baja caducifolia	10	Guzmán-Cruz 995
	Mpio. Terán, La Chacona, NO de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	Selva mediana subcaducifolia	680	Guzmán-Cruz 1000
<i>P. militaris</i>	Mpio. Apatzingán, 5 km al N de Buenavista Tomatlán, Michoacán	Selva baja caducifolia	640	Reyes 4534
<i>P. fulviceps</i>	Mpio. Zapotitlán, 3 km al N de San Antonio Texcala, Puebla	Matorral bajo con crasicaules	1700	Arias 829
<i>P. pringlei</i>	Mpio. Hermosillo, Rancho San Gabriel (carr. a Puerto Libertad, km 9 sobre la desviación a El Desemboque), Sonora	Matorral bajo con crasicaules	225	Arias 1224
<i>M. geometrizans</i>	Mpio. San Agustín Tlaxiaca, 9 km de la carr. de San Agustín Tlaxiaca a Ajacuba, Hidalgo	Matorral bajo con crasicaules	2100	Núñez-Mariel 1

material incluido en Paraplast se tiñeron con safranina-verde fijo y algunas secciones fueron utilizadas para realizar pruebas histoquímicas (Lugol; vainillina-ácido clorhídrico, modificado de Waterman y Mole, 1994; ácido peryódico-reactivo de Schiff-azul negro de naftol, modificado de Clark, 1981).

Los cortes provenientes del material incluido en JB-4 y LR White se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes teñidos se observaron con microscopía óptica y se realizaron fotomicrografías.

Microscopía electrónica de barrido

Algunas anteras de flores en preantesis y semillas de los frutos maduros recolectados en el campo fueron depositados en bolsas de papel y secados a temperatura ambiente.

El polen se colocó directamente en el portamuestras, se cubrió con oro y se observó en vista ecuatorial y polar. Las semillas se lavaron con alcohol etílico al 96% y ultrasonido antes de ser colocadas en una ionizadora Denton Vacuum Desk-II para cubrirse con oro. Debido a la variación en la forma de las células de la exotesta en las distintas regiones de la semilla, la observación de la cubierta seminal se llevó a cabo con el mismo aumento y a la misma altura de la región lateral de la semilla en todas las especies estudiadas (Fig. 1). Las observaciones y las fotografías se realizaron con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV con una aceleración de voltaje de 15 a 20 Kv.

Caracteres

Se recolectaron flores en antesis y frutos maduros de cinco individuos distintos de cada una de las especies estudiadas embriológicamente. Para la obtención de los caracteres anatómicos cuantitativos (Cuadro 3) se realizaron cortes longitudinales medianos de óvulos y semillas maduros. Las imágenes de los cortes fueron digitalizadas y posteriormente se realizaron las mediciones correspondientes mediante el programa Zeiss Image versión 3.0 para Windows (Media Cybernetics, 1997). Se utilizaron los caracteres propuestos por Flores y Engleman (1976) y Flores (1976) para la descripción anatómica de óvulos y semillas. Los caracteres que fueron empleados para describir la micromorfología de las semillas están basados en la terminología utilizada por Barthlott y Hunt (2000), aunque se realizaron algunas modificaciones en la definición de los estados de carácter con el fin de detectar la variación entre las especies estudiadas.

- 1) Se estimó la curvatura de la nucela en el óvulo midiendo el ángulo formado por el eje principal de la nucela y un eje perpendicular a la línea que une los puntos de origen del tegumento interno dorsal y ventral (Fig. 2a).
- 2) Para la estimación de la curvatura micropilar en el óvulo, se midió el ángulo entre el eje principal de la nucela y el eje del canal micropilar (Fig. 2b).
- 3) La relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo se calculó dividiendo la longitud del micrópilo entre el mayor diámetro del óvulo.
- 4) La distancia relativa del tegumento externo libre ventral en el óvulo se obtuvo midiendo la longitud de éste y dividiéndola entre el largo máximo del óvulo.

- 5) El engrosamiento del tegumento externo se describió a partir de las observaciones de las células con paredes periclinales externas gruesas, las cuales pueden encontrarse a lo largo de toda la región dorsal del tegumento hasta llegar al micrópilo o solamente hasta una zona cercana a él pero sin alcanzarlo.
- 6) La curvatura de la nucela en la semilla se calculó de manera similar a la curvatura de la nucela en el óvulo (carácter 1).
- 7) La curvatura del embrión fue calculada midiendo el ángulo entre el eje principal del hipocótilo y una línea paralela al eje principal de los cotiledones (Fig. 2c).
- 8) La razón entre el largo total del embrión y el largo cotiledonar se calculó dividiendo la longitud del embrión entre la longitud de los cotiledones.
- 9) La razón entre el largo total del embrión y el ancho del hipocótilo se obtuvo al dividir la longitud del embrión entre la longitud de una línea ortogonal dibujada a la altura de las dos terceras partes del eje mayor del hipocótilo a partir de la radícula (Fig. 2d).
- 10) Debido a que el tejido nucelar es consumido durante el desarrollo de la semilla, para obtener el área nucelar en la semilla madura se calculó el área circunscrita por la cutícula de la nucela y se utilizó como divisor para obtener la razón entre el área del perispermo y el área nucelar.
- 11) Se midió el grosor de la pared periclinal externa de la exotesta y el grosor de la pared anticlinal doble entre células adyacentes en esta misma capa, utilizando la primera medida como dividendo y la segunda como divisor para cuantificar la relación entre el grosor de ambas paredes.
- 12) La altura celular de la exotesta se consideró homogénea cuando la longitud de

las paredes anticlinales entre células era similar y se consideró heterogénea cuando era variable.

13) El largo de la semilla se obtuvo midiendo su diámetro mayor.

14) Se consideró como el ancho de la semilla al diámetro mayor perpendicular al largo de la semilla.

15) El relieve de la pared periclinal externa de la exotesta puede ser plano, ligeramente convexo cuando el domo es apenas notorio, convexo cuando el domo es muy evidente y fuertemente convexo cuando el domo es muy alto.

16) La cutícula de la semilla puede ser lisa o presentar estrías.

17) La forma de las células de la exotesta se consideró poligonal cuando presentaba distintas figuras geométricas (cuadrado, pentágono, etc.), se consideró hexagonal cuando todas las células observadas tuvieron esta forma, irregular cuando no eran reconocibles polígonos regulares e irregular-alargada cuando no era posible reconocer polígonos regulares y algunos lados eran considerablemente mayores que otros.

18) Los puntos de separación entre tres o más células de la exotesta pueden no presentar hoyos, en cuyo caso son indiferenciados, o bien, presentar hoyos diminutos o profundos.

19) Se consideró que el microrelieve de las paredes periclinales externas de la exotesta era no evidente en las semillas cuya cutícula estriada no permite observar la microescultura de la superficie en estas paredes. En las semillas con cutícula lisa fue posible observar que el microrelieve podía ser diminutamente verrugoso, verrugoso o rugoso.

20) Se consideró que la orientación de la región hilo-micropilar era basal cuando su eje principal era perpendicular al eje principal de la semilla y como oblicua cuando el ángulo entre ambos ejes era menor.

21) El arreglo celular, el tamaño de las células y el relieve de las paredes periclinales de la exotesta que rodea a la región hilo-micropilar pueden ser diferentes a los que se encuentran en el resto de la semilla. El borde de la región hilo-micropilar se consideró no expandido cuando no había una clara diferenciación de esta zona, ligeramente expandido cuando la diferenciación de esta zona es gradual y expandido cuando la diferenciación es abrupta.

22) La región hilo-micropilar puede presentar distintas profundidades, en orden de mayor a menor, se consideraron como impresa, ligeramente impresa y superficial.

Análisis fenético

Además de las especies estudiadas embriológicamente en esta investigación, se incluyeron en el análisis fenético a *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose, *Stenocereus dumortieri* (Scheidw.) Buxb., *Polaskia chende* (Roland-Gosselin) Gibson & Horak y *Escontria chiotilla* (Weber ex Schumann) Rose, las cuales también pertenecen a la tribu Pachycereeae (Barthlott y Hunt, 1993). Los datos de los caracteres anatómicos y micromorfológicos de estas últimas especies se obtuvieron de la literatura (Flores, 1976; Flores y Engleman, 1976; Barthlott y Hunt, 2000).

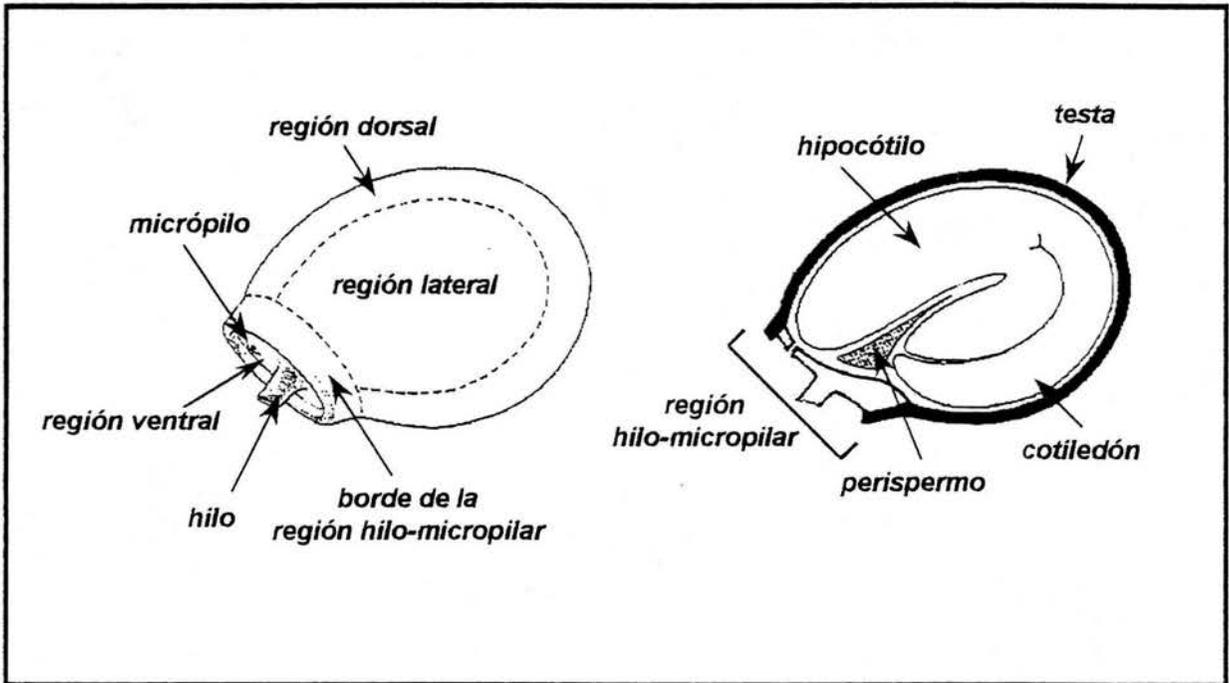


Figura 1. Diagrama de la semilla de una cactácea (Modificado de Barthlott y Voit, 1979).

Cuadro 3. Caracteres anatómicos y micromorfológicos de óvulos y semillas

CARACTER	ESTADO DE CARACTER
1. Curvatura de la nucela en el óvulo	(grados)
2. Curvatura micropilar en el óvulo	(grados)
3. Relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo	(razón)
4. Distancia relativa del tegumento externo libre ventral	(razón)
5. Engrosamiento del tegumento externo	0 = engrosamiento incompleto en la parte dorsal (no llega hasta el micrópilo) 1 = engrosamiento en la parte dorsal (alcanza el micrópilo)
6. Curvatura de la nucela en la semilla	(grados)
7. Curvatura del embrión	(grados)
8. Razón entre el largo total del embrión y el largo cotiledonar	(razón)
9. Razón entre el largo total del embrión y el ancho del hipocótilo	(razón)
10. Razón entre el área del perispermo y el área nucelar	(razón)
11. Razón entre el grosor de la pared periclinal externa de la exotesta y el grosor de las paredes anticlinales	(razón)
12. Altura celular de la exotesta	0 = homogénea 1 = no homogénea
13. Largo de la semilla	(mm)
14. Ancho de la semilla	(mm)
15. Relieve de la pared periclinal externa de la exotesta	0 = plano 1 = ligeramente convexo 2 = convexo 3 = fuertemente convexo
16. Cutícula de la semilla	0 = lisa 1 = estriada
17. Forma de la pared periclinal externa de la exotesta	0 = poligonal 1 = hexagonal 2 = irregular 3 = irregular-alargada
18. Puntos de separación entre tres o más células de la exotesta	0 = indiferenciadas 1 = hoyos diminutos 2 = hoyos profundos
19. Microrelieve de las paredes periclinales externas de la exotesta	0 = no evidente 1 = liso 2 = diminutamente verrugoso 3 = verrugoso 4 = rugoso
20. Orientación de la región hilo-micropilar	0 = oblicua 1 = basal
21. Borde de la región hilo-micropilar	0 = no expandido 1 = ligeramente expandido 2 = expandido
22. Profundidad de la región hilo-micropilar	0 = superficial 1 = ligeramente impresa 2 = impresa

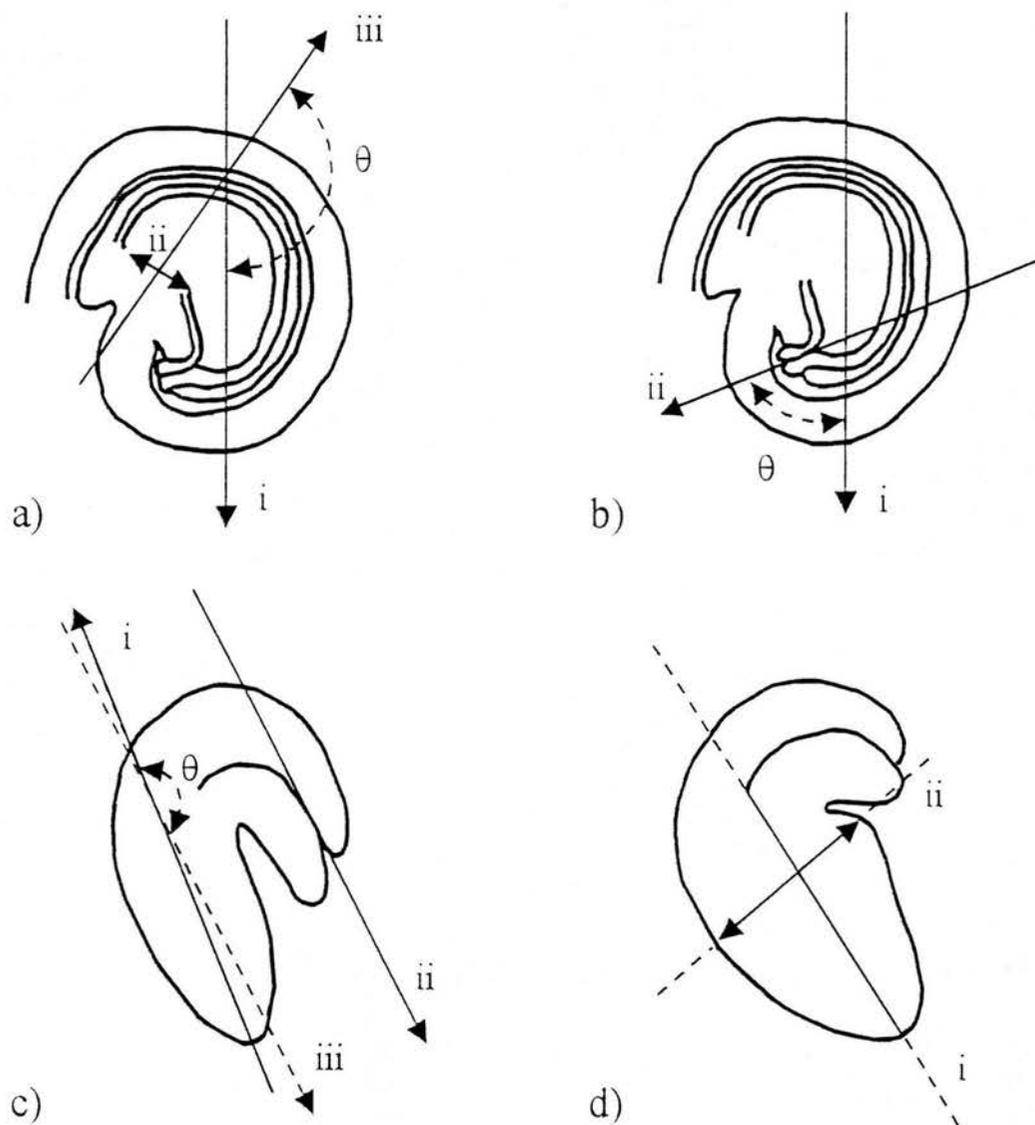


Figura 2. Representación esquemática de las medidas de caracteres embriológicos (Tomado de Flores, 1976). 2a. Curvatura de la nucela (i, eje principal de la nucela; ii, línea que une los puntos de origen dorsal y ventral del tegumento interno; iii, línea perpendicular a ii). 2b. Curvatura micropilar (i, eje principal de la nucela; ii, eje del canal micropilar). 2c. Curvatura del embrión (i, eje principal del hipocótilo; ii, eje principal de los cotiledones; iii, línea paralela al eje principal de los cotiledones). 2d. Proporción entre el largo total del embrión y el ancho del hipocótilo (i, eje principal del embrión; ii, línea ortogonal dibujada a las dos terceras partes de la distancia de la radícula).

Cuadro 4. Matriz básica de datos

ESPECIES	CARACTERES																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. <i>Escontria chiotilla</i>	162	21	0.240	0.15	0	180	172	2.40	4.180	0.0260	13.50	1	1.8	1.2	3	1	0	1	0	0	2	2
2. <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	122	38	0.270	0.17	0	136	120	2.70	3.000	0.0010	7.66	1	1.6	1.3	2	1	0	2	0	2	2	2
3. <i>Pachycereus gaumeri</i>	120	7	0.142	0.082	1	218	216	3.33	3.940	0.0235	19.10	0	3.7	2.6	0	0	3	1	4	0	0	0
4. <i>Pachycereus fulviceps</i>	136	26	0.146	0.125	1	167	182	2.34	3.620	0.0212	20.90	0	2.7	2.0	0	0	3	0	3	0	0	1
5. <i>Pachycereus marginatus</i>	135	44	0.200	0.17	1	153	158	2.54	3.450	0.0080	5.00	1	3.5	2.4	1	0	2	1	4	0	1	1
6. <i>Pachycereus militaris</i>	138	19	0.152	0.131	1	231	233	2.38	4.300	0.0084	8.20	0	5.2	3.7	0	0	1	0	2	0	0	0
7. <i>Pachycereus pringlei</i>	148	13	0.141	0.112	1	171	194	1.98	4.080	0.0089	12.30	0	3.2	2.4	0	0	3	0	1	0	0	0
8. <i>Polaskia chende</i>	148	36	0.210	0.16	0	167	160	2.40	3.620	0.0070	12.50	0	1.6	1.2	2	1	0	2	0	2	2	2
9. <i>Stenocereus dumortieri</i>	130	50	0.210	0.18	1	165	162	2.52	3.500	0.0080	5.00	0	1.8	1.1	2	1	0	1	0	1	2	2

Se construyó una matriz básica de datos con 9 especies y 21 caracteres anatómicos y micromorfológicos de óvulos y semillas maduros (Cuadro 4). La matriz fue estandarizada por hileras, utilizando la media de los caracteres como opción de substracción y la desviación estándar de los caracteres como opción de división. Se calculó una matriz de distancias (distancia taxonómica promedio). El análisis de conglomerados se obtuvo con el método de UPGMA ("Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Averages"). El análisis de componentes principales se llevó a cabo a partir de una matriz de correlación entre caracteres. Estos análisis fueron realizados con el programa NTSYSpc versión 2.0 (Rohlf, 1997).

Resultados

Desarrollo de la antera

El desarrollo de las anteras es muy similar en las cinco especies estudiadas (Cuadro 5). En todas las especies, las anteras son bilobuladas y tetrasporangiadas. El conectivo de la antera presenta drusas (Fig. 3). El desarrollo de la pared de la antera es de tipo monocotiledóneo (Fig. 4). La pared de la antera en etapa de células madres de las microsporas está formada por cuatro estratos: epidermis, endotecio, capa media y tapete (Fig. 5). El tapete presenta dos o más núcleos y es de tipo secretor. La citocinesis en *P. militaris* es simultánea (Figs. 6 y 7), en las especies restantes no se observó esta etapa. En todas las especies, cada una de las células madres de las microsporas se divide meióticamente y forma una tétrada tetraédrica (Fig. 8). Cuando se degrada la calosa que rodea las

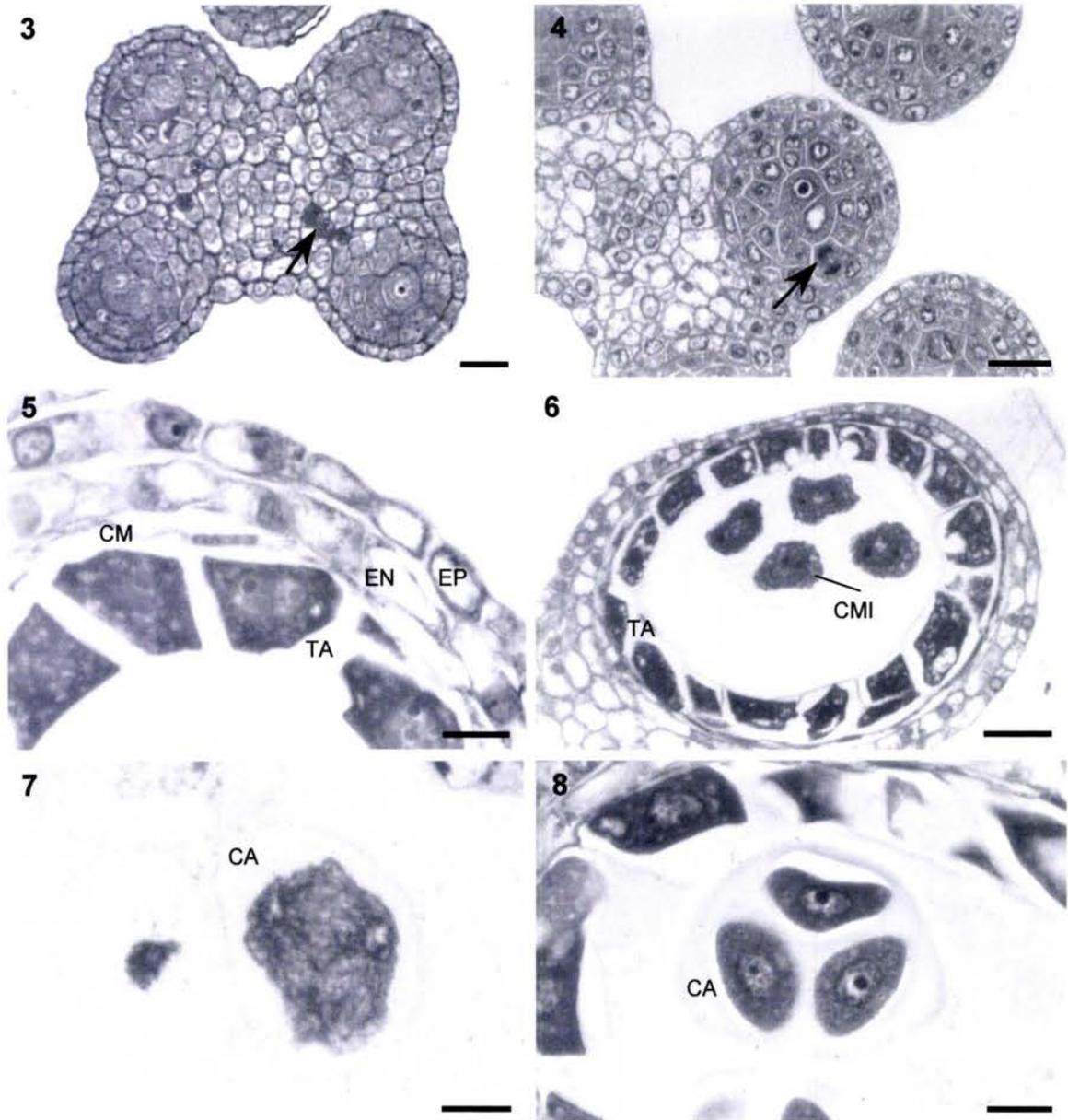
microsporas, se separan granos de polen unicelulares (Fig. 9), los cuales se dividen y forman una célula vegetativa y una célula generatriz (Fig. 10). En esta etapa las células del tapete degeneran. Se observaron cuerpos de Ubisch en *P. gaumeri* y *P. pringlei*. La célula generatriz se divide formando dos células espermáticas (Fig. 11), de tal manera, que en el momento de la dehiscencia de la antera, los granos de polen son tricelulares. En esta etapa la pared de la antera está constituida exclusivamente por el endotecio y la epidermis (Fig. 12). El endotecio, constituido por un estrato, presenta engrosamientos celulósicos (Fig. 13).

Myrtillocactus geometrizans presenta taninos en la epidermis de la antera desde las primeras etapas de desarrollo de los microsporangios, en las anteras maduras los núcleos degeneran y los taninos ocupan todo el espacio celular (Fig. 14). En *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei*, la epidermis de la antera está constituida por un estrato de células aplanadas con núcleos conspicuos y sin taninos.

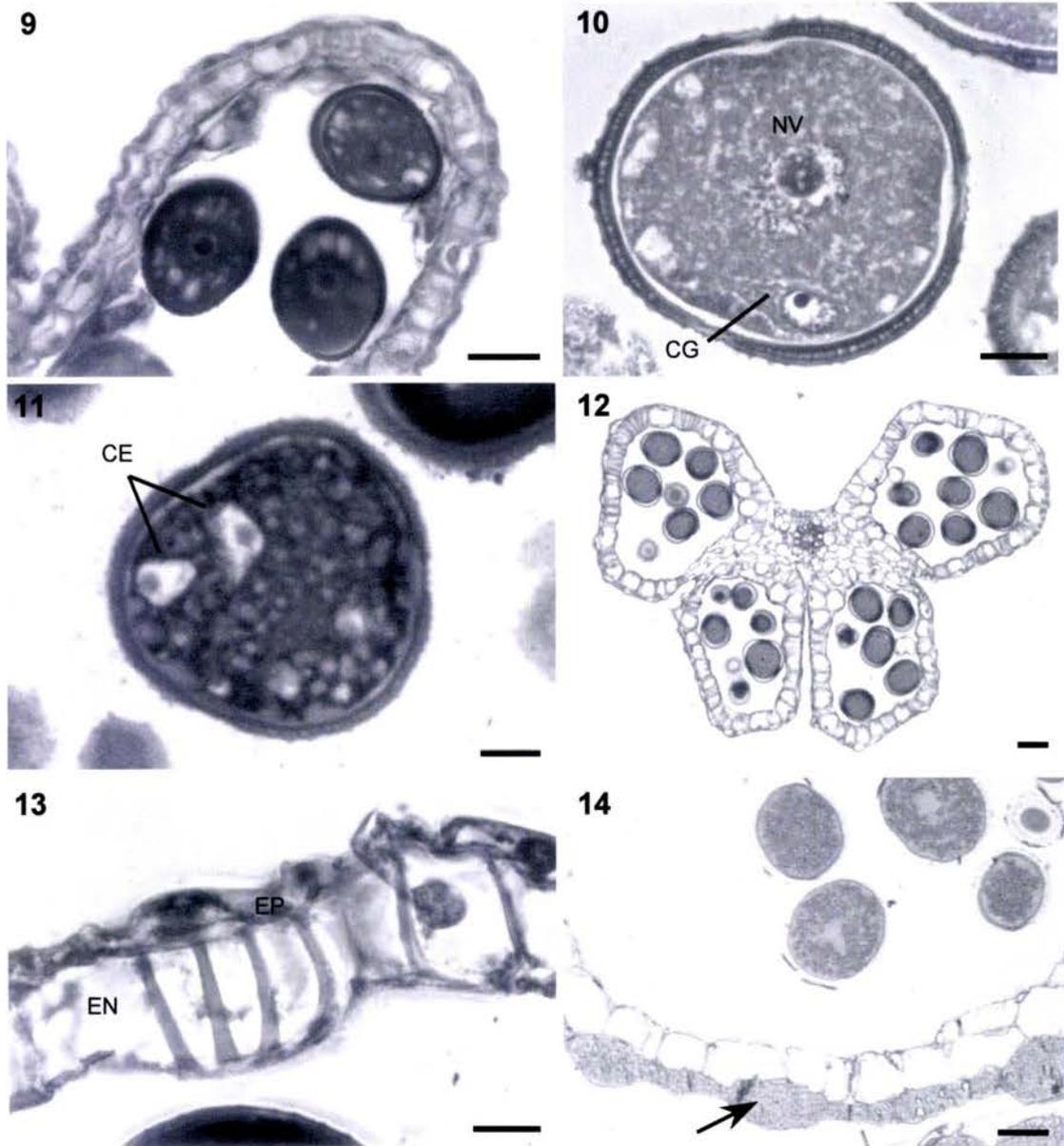
El polen de *Pachycereus fulviceps* (Figs. 15-18), *P. gaumeri* (Figs. 19-22), *P. militaris* (Figs. 23-26), *P. pringlei* (Figs. 27-30) y *M. geometrizans* (Figs. 31-34) es esférico, tricolpado, espinulado y anulopunctitegilado. La membrana de las aberturas es de granulosa a verrugosa y espinulada.

Cuadro 5. Resumen de las características del desarrollo de las anteras y la micromorfología de los granos de polen que comparten *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*

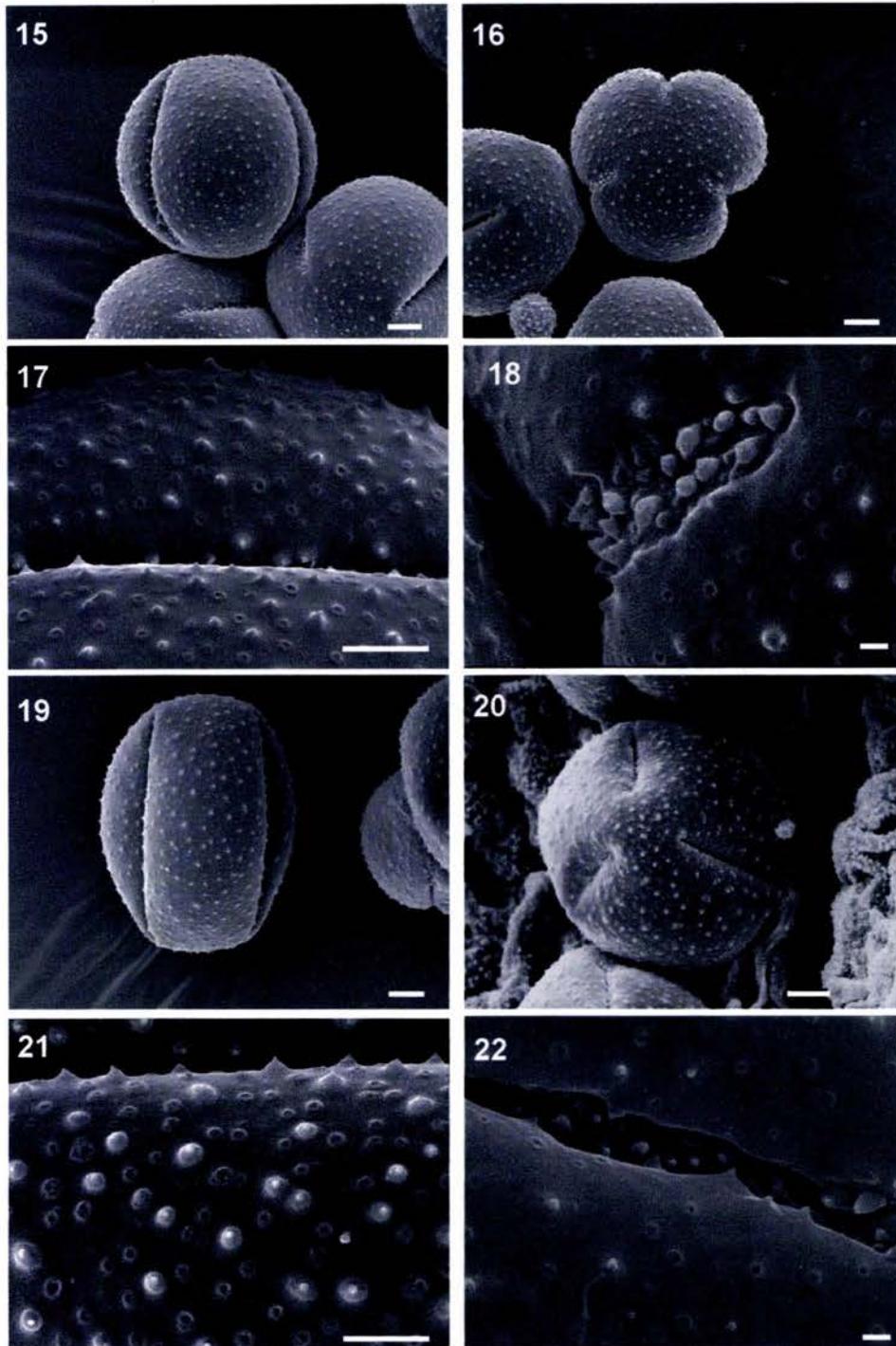
CARACTERES	<i>P. fulviceps</i>	<i>P. gaumeri</i>	<i>P. militaris</i>	<i>P. pringlei</i>	<i>Myrtillocactus</i>
Número de lóbulos	dos				
Número de microsporangios	cuatro				
Tipo de desarrollo de la pared	monocotiledóneo				
Pared de la antera en etapa de microsporocitos	formada por epidermis, endotecio, capa media y tapete				
Pared de la antera en anthesis	formada por epidermis y endotecio				
Endotecio	con engrosamientos				
Capa media	efímera				
Tapete	secretor				
Número de núcleos en el tapete	dos o más				
Drusas en el conectivo	sí				
Tipo de tétrada de microsporas	tetraédrica				
Número de células en el grano de polen maduro	tres				
Forma de los granos de polen	esferoidal				
Aberturas de los granos de polen	tres colpos				
Membrana de las aberturas del polen	granulosa a verrugosa y espinulada				
Exina	espinulada y anulopunctitegilada				



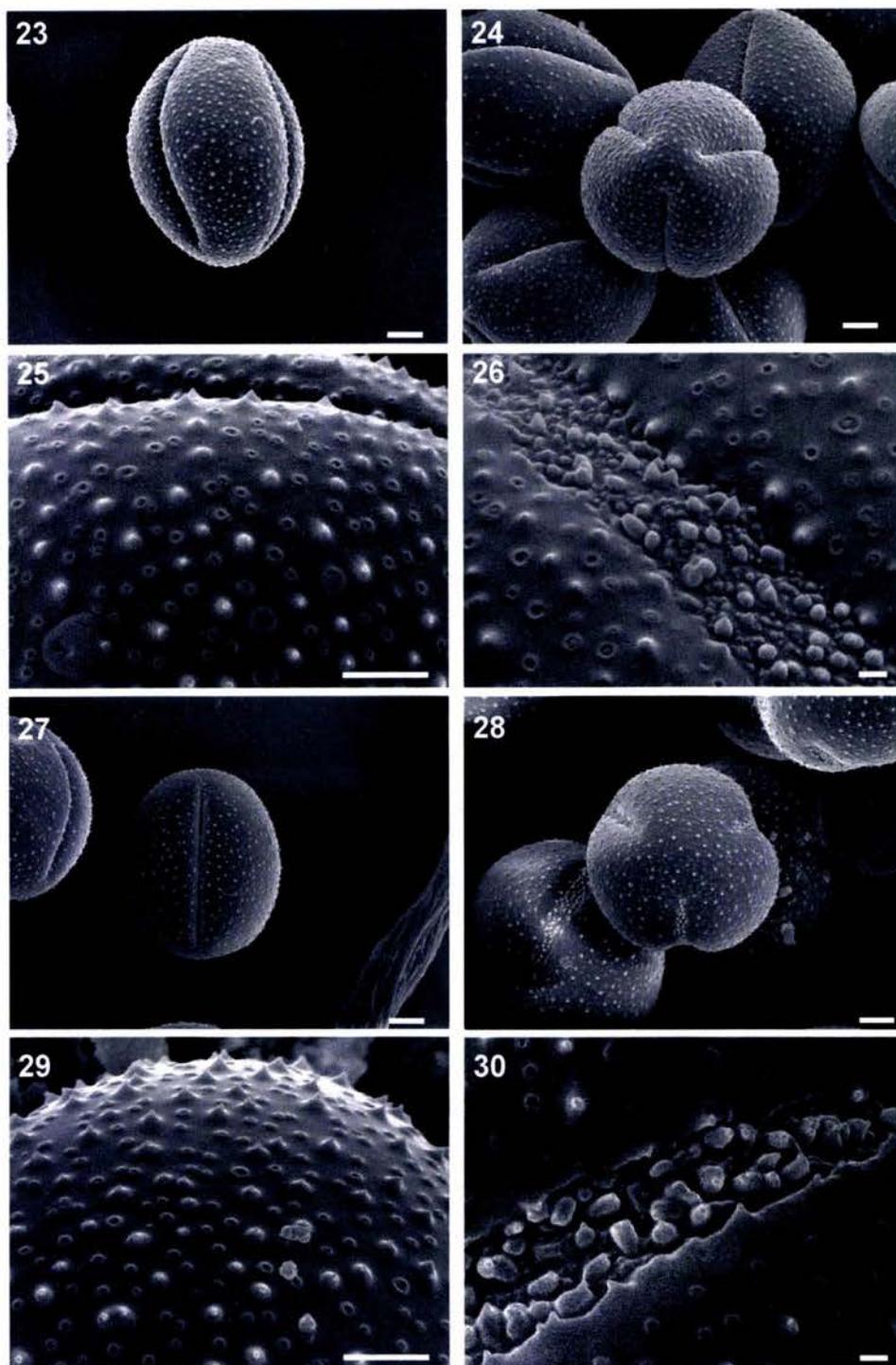
Figuras 3-8. Cortes transversales de antera. **3.** Antera inmadura de *P. gaumeri* con drusas en el conectivo (flecha); escala = 50 μm . **4.** Microsporangio de *P. pringlei* en donde se observa la división de la capa parietal secundaria interna (flecha); escala = 50 μm . **5.** Pared de antera inmadura de *P. fulviceps* con epidermis (EP), endotecio (EN), capa media (CM) y tapete binucleado (TA); escala = 10 μm . **6.** Microsporangio de *P. militaris* con células madres de las microsporas en meiosis (CMI) y tapete vacuolado (TA); escala = 25 μm . **7.** Tétrada de microsporas de *P. militaris* originada por citocinesis simultánea y rodeada por calosa (CA); escala = 10 μm . **8.** Tétrada tetraédrica de microsporas de *P. fulviceps* rodeada por calosa (CA); escala = 10 μm .



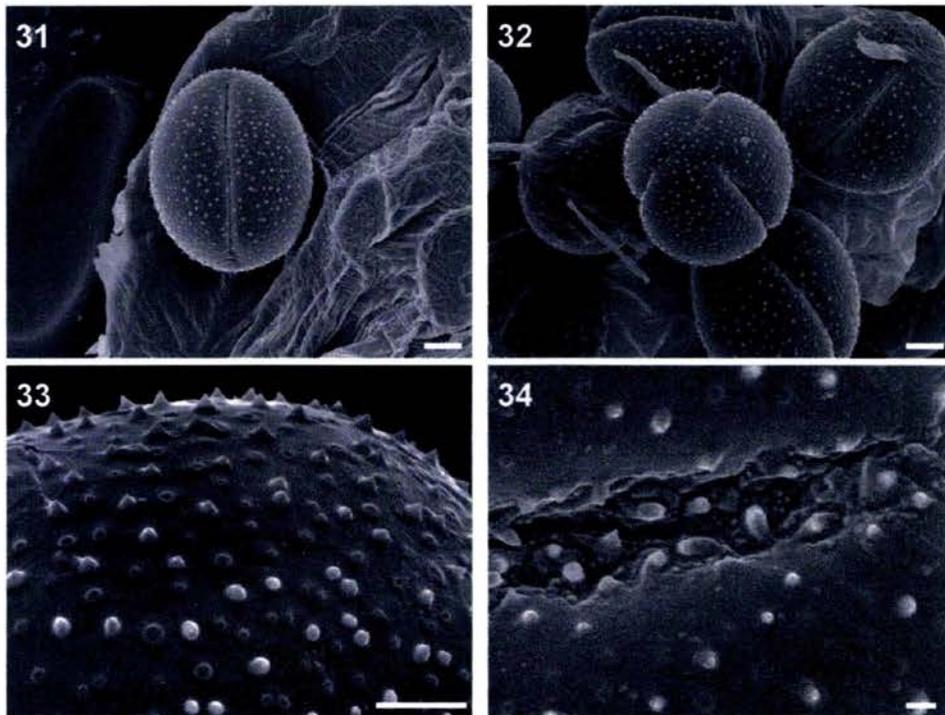
Figuras 9-14. Cortes transversales de antera. **9.** Microsporangio de *P. gaumeri* con granos de polen unicelulares; escala = 25 μm . **10.** Grano de polen de *P. fulviceps* mostrando el núcleo de la célula vegetativa (NV) y la célula generatriz (CG); escala = 10 μm . **11.** Grano de polen de *P. militaris* con células espermáticas (CE); escala = 10 μm . **12.** Antera de *P. pringlei* con granos de polen maduros; escala = 100 μm . **13.** Pared de la antera en anthesis de *P. fulviceps* formada por endotecio con engrosamientos (EN) y epidermis (EP); escala = 10 μm . **14.** Antera madura de *M. geometrizans* con taninos en la epidermis (flecha); escala = 30 μm .



Figuras 15-18. Micromorfología del polen de *P. fulviceps* (MEB). **15.** Vista ecuatorial; escala = 10 μm . **16.** Vista polar; escala = 10 μm . **17.** Detalle de la ornamentación de la exina; escala = 5 μm . **18.** Detalle de la abertura; escala = 1 μm . **Figuras 19-22.** Micromorfología del polen de *P. gaumeri* (MEB). **19.** Vista ecuatorial; escala = 10 μm . **20.** Vista polar; escala = 10 μm . **21.** Detalle de la ornamentación de la exina; escala = 5 μm . **22.** Detalle de la abertura; escala = 1 μm .



Figuras 23-26. Micromorfología del polen de *P. militaris* (MEB). **23.** Vista ecuatorial; escala = 10 μm . **24.** Vista polar; escala = 10 μm . **25.** Detalle de la ornamentación de la exina; escala = 5 μm . **26.** Detalle de la abertura; escala = 1 μm . **Figuras 27-30.** Micromorfología del polen de *P. pringlei*. **27.** Vista ecuatorial; escala = 10 μm . **28.** Vista polar; escala = 10 μm . **29.** Detalle de la ornamentación de la exina; escala = 5 μm . **30.** Detalle de la abertura; escala = 1 μm .



Figuras 31-34. Micromorfología del polen de *M. geometrizzans* (MEB). **31.** Vista ecuatorial; escala = 10 μm . **32.** Vista polar; escala = 10 μm . **33.** Detalle de la ornamentación de la exina; escala = 5 μm . **34.** Detalle de la abertura; escala = 1 μm .

Desarrollo del óvulo

El desarrollo del óvulo también es muy similar en las cinco especies estudiadas (Cuadro 6). En todas ellas, el ovario es unilocular y la placentación es parietal. Los primordios de óvulo (Fig. 35) emergen de la parte media de cada carpelo. El arqueosporio sólo fue observado en *P. fulviceps*, *P. militaris* y *P. pringlei*, estando formado por una célula hipodérmica (Fig. 36). Esta célula se divide periclinalmente y da lugar a una célula esporógena en la parte más interna y una célula parietal adyacente a la protodermis (Fig. 37). En las cinco especies, la célula parietal se divide anticlinalmente varias veces y forma un estrato celular que separa a la célula madre de las megasporas de la epidermis, por lo que los óvulos son crasinucelados.

Los óvulos presentan tegumento externo y tegumento interno. Ambos tegumentos se originan a partir de la epidermis nucelar (Fig. 37). Los óvulos comienzan a curvarse desde que empieza a diferenciarse el tegumento interno. Existe un crecimiento diferencial entre los dos tegumentos. El tegumento interno comienza a formarse antes que el tegumento externo. El tegumento interno inicia su desarrollo en forma anular alrededor de la nucela, a diferencia del tegumento externo, el cual se desarrolla inicialmente sólo en la parte dorsal, la parte ventral comienza a formarse posteriormente (Figs. 38 y 39). Conforme avanza el desarrollo de la célula madre de las megasporas, los tegumentos van cubriendo gradualmente la nucela. Además de la curvatura del óvulo propiciada por el desarrollo de los

Cuadro 6. Resumen de las características del óvulo que comparten *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*

CARACTERES	<i>P. fulviceps</i>	<i>P. gaumeri</i>	<i>P. militaris</i>	<i>P. pringlei</i>	<i>Myrtillocactus</i>
Tipo de óvulo con respecto al origen de la nucela	crasinucelado				
Número de tegumentos	dos				
Estratos de los tegumentos	dos				
Tipo de óvulo	campilótropo				
Micrópilo	formado por el tegumento interno				
Antípodas	efímeras				
Ovocélula	sí				
Célula central con núcleos polares	sí				
Sinérgidas	sí				
Granos de almidón en el saco embrionario	sí				
Espacio aéreo entre tegumentos	sí				
Protuberancia funicular	sí				
Haz vascular	hasta la cálaza				
Capuchón nucelar (células epidérmicas de la nucela alargadas)	presente				
Tricomas en el funículo	región ventral				

tegumentos, el funículo presenta un mayor crecimiento en la parte dorsal que en la ventral, por lo que también se curva, y en consecuencia, el micrópilo queda en contacto con el funículo (Fig. 40).

La célula madre de las megasporas se alarga y aumenta considerablemente de tamaño antes de entrar en meiosis (Fig. 41). Como resultado de la primera división meiótica, en *P. gaumeri* se observó una díada (Fig. 42). En esta misma especie se encontró que algunas veces, sólo una de las células de la díada se divide nuevamente, por lo que se forma una tríada (Fig. 43), aunque también puede suceder que se dividan ambas células de la díada (Fig. 44), lo que da lugar a una tétrada de megasporas (Fig. 45). En *Pachycereus militaris* sólo se observó una tríada. Tanto en las tríadas como en las tétradas, la megaspora funcional es la calazal y las células restantes degeneran.

En *Myrtillocactus geometrizans* se observó un saco embrionario con dos núcleos derivados de la primera división mitótica del núcleo de la megaspora funcional; uno de estos núcleos se desplaza hacia la zona calazal y el otro hacia la zona micropilar (Fig. 46). Ambos se dividen nuevamente, para dar lugar a un saco embrionario con dos núcleos en posición calazal y dos en posición micropilar.

Se observaron antípodas en *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* (Fig. 47) y *M. geometrizans*. Las antípodas son efímeras. En las cinco especies estudiadas, el saco embrionario de las flores en preantesis está formado por a) dos células

sinérgidas con citoplasma denso, una vacuola calazal y aparato filiforme (Fig. 48), b) una célula central con dos núcleos polares rodeados por granos de almidón y c) una ovocélula (Fig. 49). Antes de que se lleve a cabo la fecundación, los núcleos polares se fusionan (Fig. 50) y las sinérgidas comienzan a degenerar.

El óvulo maduro en las cinco especies, es campilótropo y bitégmico. El funículo circunda al óvulo parcialmente (Fig. 51). Se encuentran numerosos tricomas en la región ventral del funículo (Fig. 52). Tanto el tegumento interno como el externo son biestratificados, aunque es mayor el número de estratos en la región micropilar. El tegumento interno forma el micrópilo y está en contacto con la parte ventral del funículo (Fig. 53). Algunas células de la nucela en la región micropilar son más largas que las restantes y forman un canal que permite el paso del tubo polínico para alcanzar el saco embrionario. La parte ventral del tegumento externo está fusionada con el funículo (rafe). Las cinco especies presentan protuberancia funicular y un espacio aéreo intertegumentario cerca de la cálaza (Fig. 54). En *Myrtillocactus geometrizans* se depositan taninos en la epidermis externa del tegumento externo dorsal y en el funículo (Fig. 55) desde las primeras etapas de la megagametogénesis, a diferencia de las especies de *Pachycereus* estudiadas, las cuales presentan taninos, pero hasta después de la fecundación y solamente en la epidermis del tegumento externo, no en el funículo.

Fecundación y desarrollo de la semilla

La fecundación es porógama (Fig. 56). Se observó en *P. fulviceps* un tubo polínico

descargando su contenido en una de las células sinérgidas (Fig. 57) y en *P. gaumeri*, la fusión de uno de los núcleos espermáticos con los núcleos polares (Fig. 58) para dar lugar al núcleo primario del endospermo. El cigoto es ovoide (Fig. 59) y la primera división da origen a un proembrión con la célula apical más pequeña que la basal (Fig. 60). La célula basal presenta una vacuola muy grande que desplaza el núcleo hacia uno de los costados. Algunas divisiones en los proembriones son oblicuas (Figs. 61 y 62). En todas las especies estudiadas se encontraron embriones columnares (Fig. 63). Las células apicales del embrión columnar se dividen en diferentes direcciones y forman el embrión globular (Fig. 64); las células basales, grandes y vacuoladas, dan origen al suspensor. A partir del embrión globular se forman los primordios de los cotiledones que le dan al embrión forma de corazón (Fig. 65). El embrión maduro es curvo, ocupa casi todo el espacio de la semilla y posee reservas, fundamentalmente de proteínas y lípidos (Fig. 66).

El núcleo primario del endospermo se divide y forma dos núcleos; uno de ellos se desplaza hacia la región calazal y el otro permanece en la región micropilar del saco embrionario. Estos núcleos continúan dividiéndose hasta formar una cadena que rodea a la gran vacuola central del saco embrionario. El tipo de desarrollo del endospermo es nuclear. La condición libre nuclear se mantiene hasta la formación del embrión columnar. En las primeras etapas del embrión globular comienza la citocinesis del endospermo alrededor del embrión y el estado libre nuclear se mantiene en la región calazal durante la mayor parte del desarrollo de la semilla.

El endospermo en esta zona se caracteriza por la presencia de núcleos hipertrofiados y un citoplasma muy denso con pequeñas proyecciones hacia la nucela (Fig. 67). El proceso de citocinesis del endospermo, incluyendo la zona calazal, culmina cuando los cotiledones comienzan a curvarse.

Algunas de las células de la cálaza con paredes secundarias forman una hipostasa (Fig. 68). La nucela es digerida por el saco embrionario y el endospermo. Se observaron células de la nucela desintegrándose, en la zona en contacto con las proyecciones citoplásmicas del endospermo en la región calazal. Este hecho permite inferir que el endospermo puede actuar como haustorio. Al crecer el embrión, va ocupando el espacio que inicialmente tenía la nucela y adquiere su forma curva. En la semilla madura, la nucela, considerada como perispermo por la presencia de almidón, queda reducida a un área muy pequeña cercana a la cálaza y el endospermo es tan sólo un estrato que rodea el hipocótilo y la radícula.

En las semillas de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* se depositan taninos en la exotesta y en el endotegmen después de la fecundación (Fig. 69), en cambio, en *M. geometrizzans* es posible observar taninos en estas dos capas antes de que se lleve a cabo la fecundación. La cubierta de la semilla madura en todas las especies estudiadas está formada, principalmente, por exotesta y endotegmen. La exotesta es la capa mecánica de la cubierta seminal; presenta paredes periclinales gruesas y el contenido celular está formado

exclusivamente por taninos. Las paredes anticlinales de la exotesta en una misma célula tienen la misma altura en *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* (Fig. 70), a diferencia de *M. geometrizzans*, en donde su altura puede ser variable, así como, el grosor de la pared periclinal externa (Fig. 71). La endotesta y el exotegmen se constriñen durante la maduración de la semilla. Las células del endotegmen adquieren forma plana y no engruesan sus paredes tanto como la exotesta. *Myrtillocactus geometrizzans* presenta una profunda copa hilar delimitada por las células del tegumento externo y la rafe (Fig. 72).

Micromorfología de las semillas

***Pachycereus fulviceps*.**

Semilla ovoide con simetría bilateral, negra, de 2.7 x 2.0 mm, presenta cresta dorsal y cutícula lisa (Fig. 73). Células de la exotesta de forma irregular-alargada (Fig. 74), paredes periclinales externas planas, microrelieve rugoso (Fig. 75), algunos límites celulares rectos y otros curvos, acanalados, sin hoyos en los puntos de separación entre células. Región hilo-micropilar ovada pero angosta en el extremo más cercano al hilo, superficial (Fig. 76), con posición oblicua y borde no expandido. El micrópilo se encuentra dentro de la copa hilar.

Pachycereus gaumeri

Semilla ampliamente ovoide con simetría bilateral, negra, de 3.7 x 2.6 mm, presenta cresta dorsal y cutícula lisa (Fig. 77). Células de la exotesta de forma irregular-alargada, paredes periclinales externas planas (Fig. 78), microrelieve

ligeramente verrugoso (Fig. 79), algunos límites celulares rectos y otros curvos, acanalados, con hoyos diminutos en los puntos de separación entre células. Región hilo-micropilar estrechamente ovada (Fig. 80), ligeramente impresa, con posición oblicua y borde no expandido. El micrópilo se encuentra dentro de la copa hilar.

Pachycereus militaris

Semilla ampliamente ovoide con simetría bilateral, negra, de 5.2 x 3.7 mm, presenta cresta dorsal y cutícula lisa (Fig. 81). Células de la exotesta de forma hexagonal (Fig. 82), paredes periclinales externas planas, microrelieve diminutamente rugoso (Fig. 83), límites celulares rectos, elevados, sin hoyos en los puntos de separación entre células. Región hilo-micropilar ovada (Fig. 84), superficial, con posición oblicua y borde no expandido. El micrópilo se encuentra dentro de la copa hilar.

Pachycereus pringlei

Semilla ovoide con simetría bilateral, negra, de 3.2 x 2.4 mm, presenta cresta dorsal y cutícula lisa (Fig. 85). Células de la exotesta con paredes periclinales externas planas, forma irregular-alargada (Fig. 86), microrelieve liso (Fig. 87), algunos límites celulares rectos y otros curvos, acanalados, sin hoyos en los puntos de separación entre células. Región hilo-micropilar ovada (Fig. 88), superficial, con posición oblicua y borde no expandido. El micrópilo se encuentra dentro de la copa hilar.

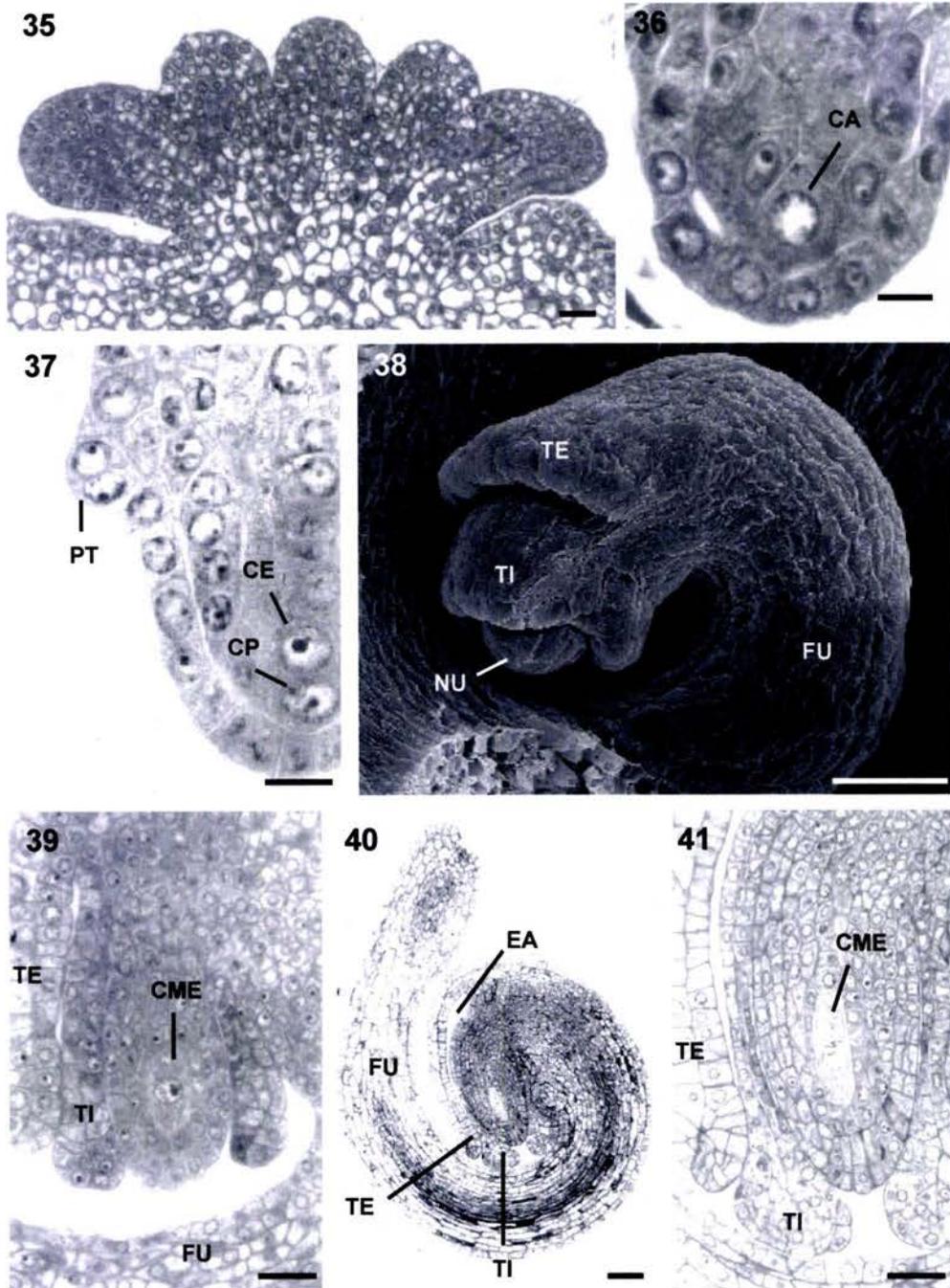
Myrtillocactus geometrizans

Semilla ovoide con simetría bilateral (Fig. 89), negra, de 1.6 x 1.3 mm, presenta cresta dorsal, escultura multicelular ruminada (*sensu* Barthlott y Hunt, 2000) y cutícula estriada (Fig. 90). Células de la exotesta con paredes periclinales externas convexas, forma poligonal, límites celulares rectos, con estrías perpendiculares (Fig. 91) y hoyos profundos en los puntos de separación entre células. Región hilo-micropilar con forma elíptica (Fig. 92), impresa, posición basal y borde expandido. El micrópilo se encuentra dentro de la copa hilar.

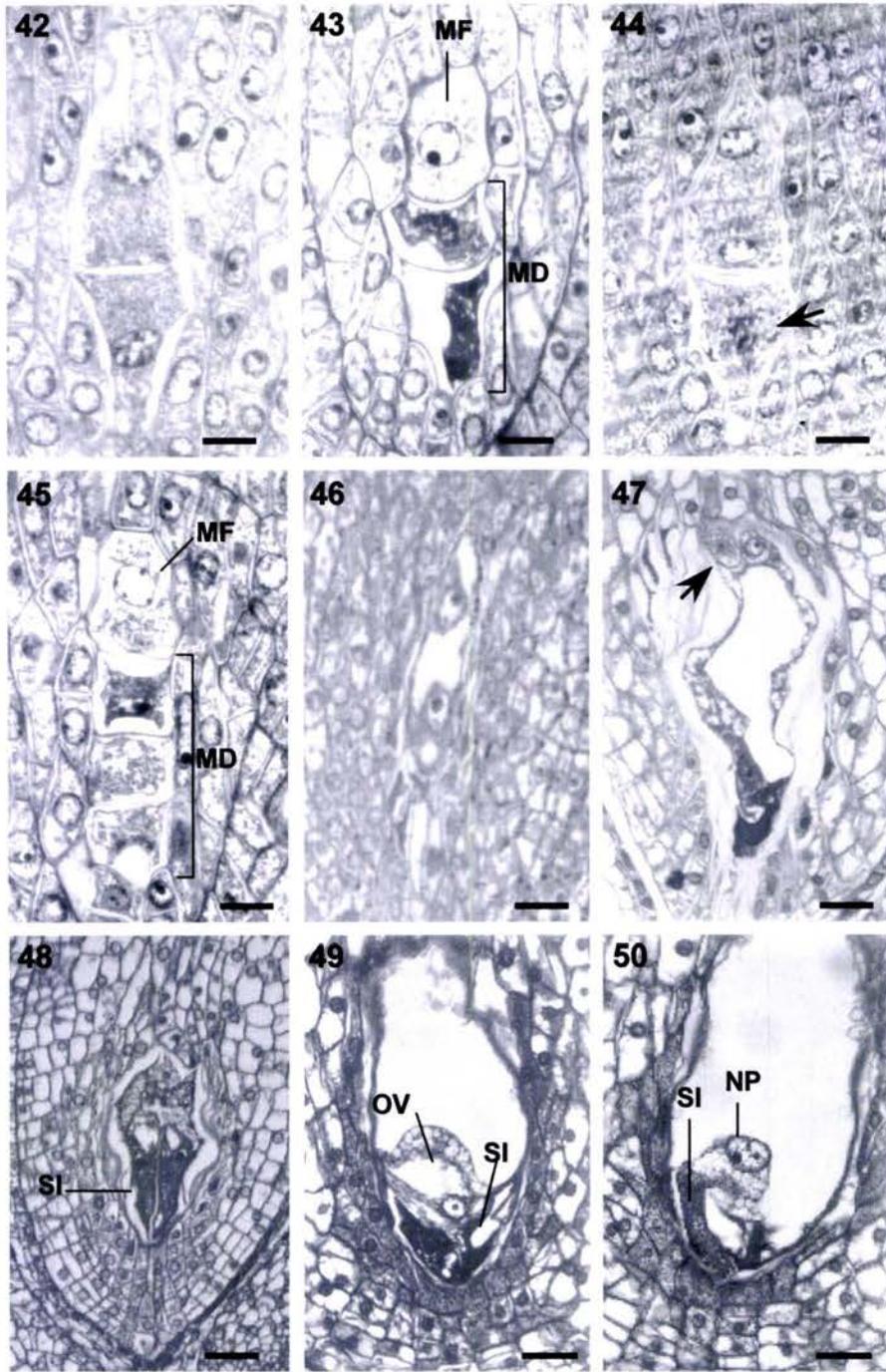
Análisis de conglomerados

El fenograma (Fig. 93), basado exclusivamente en caracteres cuantitativos y cualitativos de óvulos y semillas, se divide en dos grupos principales, uno formado por *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. marginatus*, *P. militaris* y *P. pringlei*, y el otro por *Stenocereus dumortieri*, *Polaskia chende*, *Escontria chiotilla* y *M. geometrizans*.

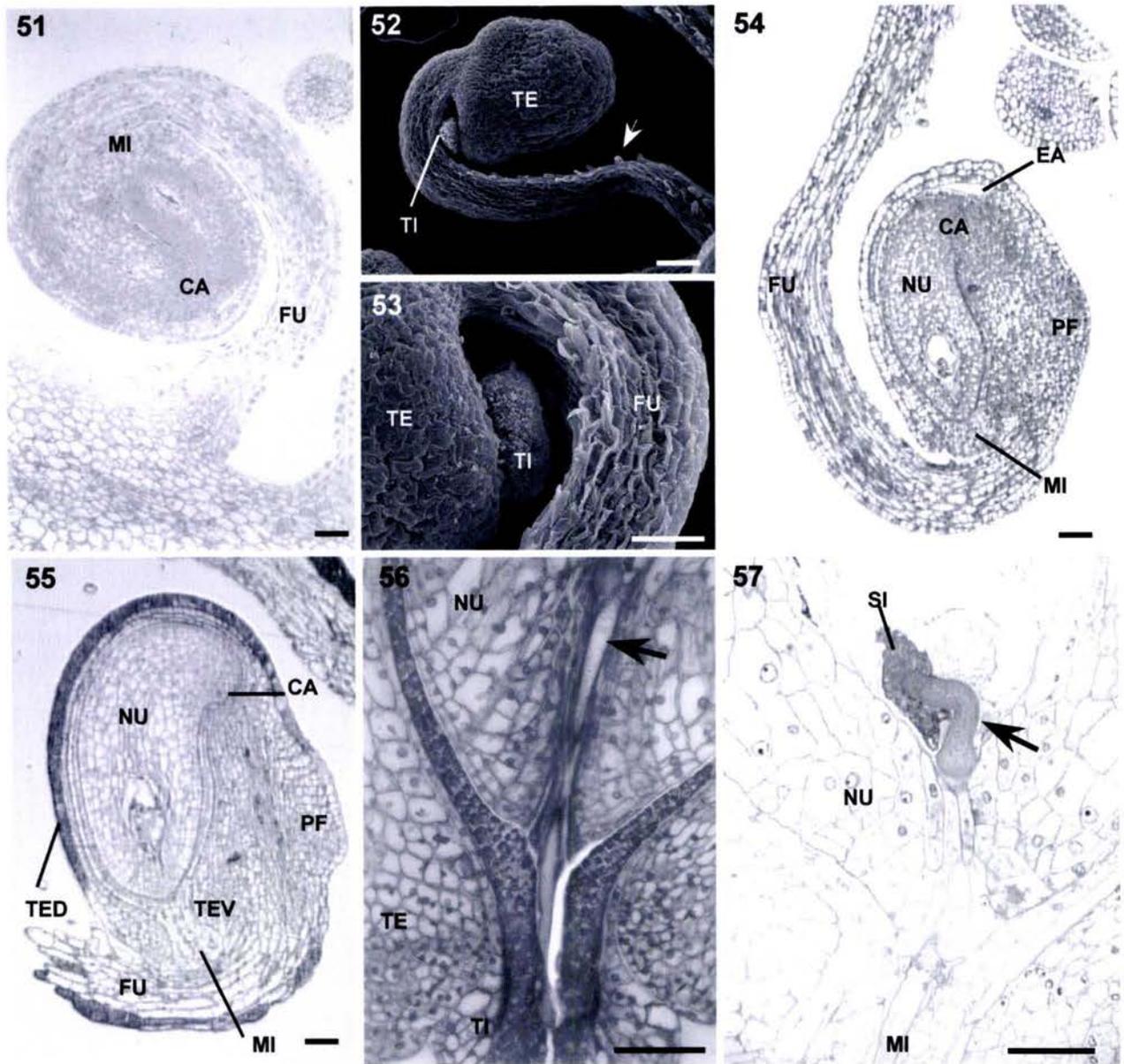
En el primer grupo se define un núcleo integrado solamente por *P. fulviceps* y *P. pringlei*. Este conglomerado se encuentra unido a *P. militaris* y éste a su vez a *P. gaumeri*. *Pachycereus marginatus* es la especie que muestra mayores diferencias con *P. pringlei*, tanto por la anatomía como por la morfología de sus óvulos y semillas. Las especies de este primer grupo pertenecen a la subtribu Pachycereinae *sensu* Gibson y Horak, 1978. En el segundo grupo, las especies que presentan mayor parecido entre óvulos y semillas son *S. dumortieri* y *P. chende*. *Myrtillocactus geometrizans* se une a éstas con una distancia menor



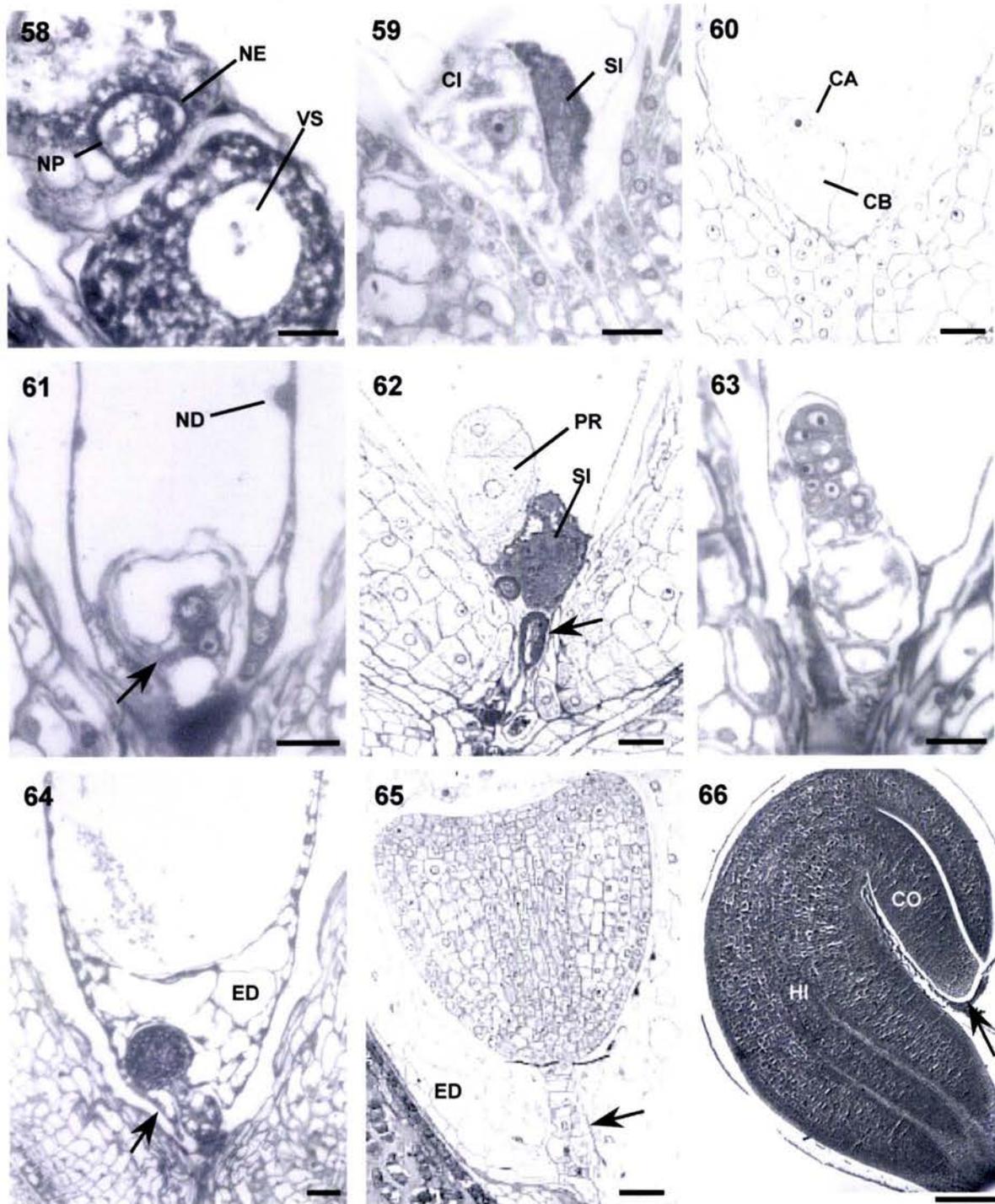
Figuras 35-41. Cortes longitudinales y micromorfología de óvulos inmaduros. **35.** Primordios de óvulo de *P. pringlei*; escala = 50 µm. **36.** Primordio de óvulo con célula arquesporrial (CA) de *P. pringlei*; escala = 10 µm. **37.** Ovulo con célula parietal (CP), célula esporógena (CE) y primordio del tegumento interno (PT) de *P. pringlei*; escala = 10 µm. **38.** Micromorfología de óvulo inmaduro de *P. pringlei* (MEB) con nucela (NU), tegumento externo (TE), tegumento interno (TI) y funículo (FU); escala = 500 µm. **39.** Ovulo inmaduro de *P. gaumeri* con célula madre de las megasporas (CME), tegumento interno (TI), tegumento externo (TE) y funículo (FU); escala = 25 µm. **40.** Ovulo en etapa de célula madre de las megasporas mostrando tegumento externo (TE), tegumento interno (TI), espacio aéreo intertegumentario (EA) y funículo (FU) en *P. gaumeri*; escala = 100 µm. **41.** Acercamiento de la figura anterior mostrando la célula madre de las megasporas (CME), tegumento interno (TI) y tegumento externo (TE) de *P. gaumeri*; escala = 25 µm.



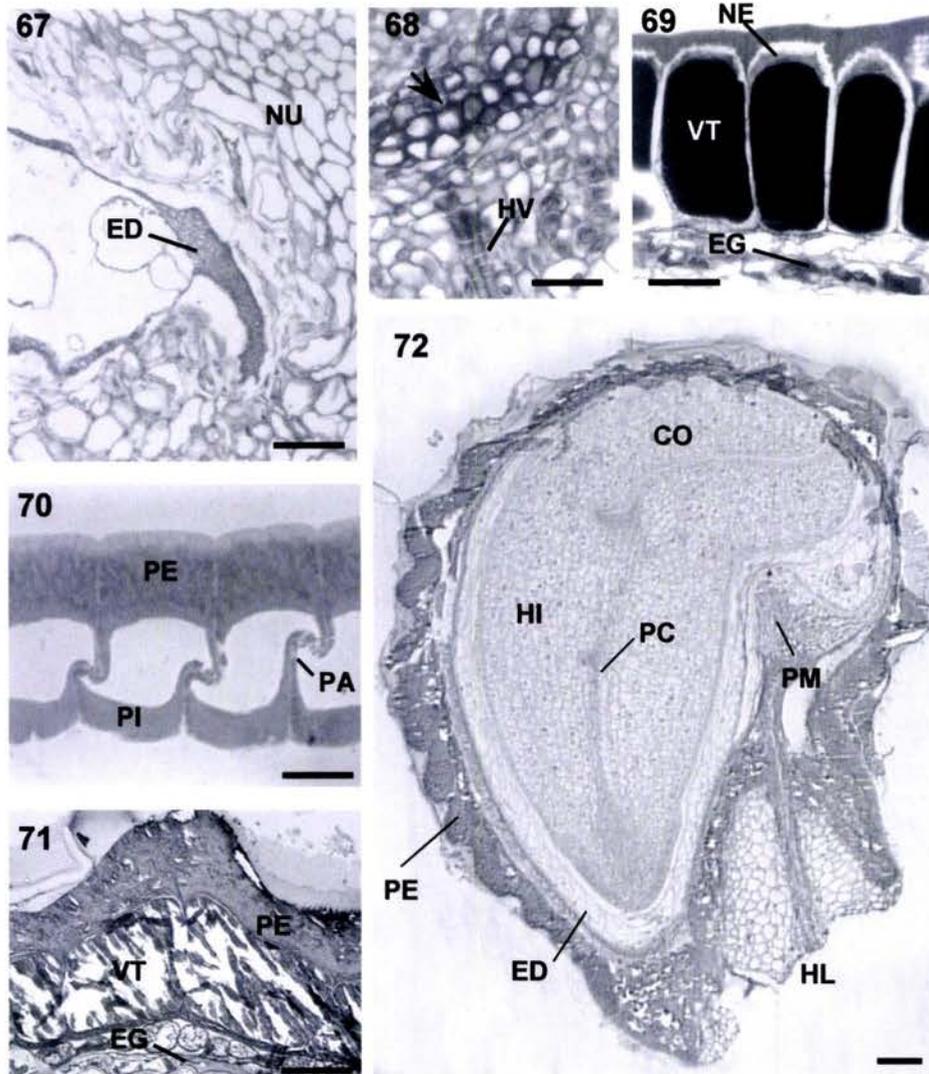
Figuras 42-50. Cortes longitudinales de óvulo orientados con la región micropilar hacia la parte inferior. **42.** Células derivadas de la primera división meiótica de la célula madre de las megasporas en *P. gaumeri*; escala = 10 μ m. **43.** Tríada de megasporas en *P. gaumeri* con megaspóra funcional calazal (MF) y células degenerando (MD); escala = 10 μ m. **44.** Formación de una tétrada de megasporas por la división de la célula micropilar (flecha) de la díada en *P. gaumeri*; escala = 10 μ m. **45.** Tétrada de megasporas con megaspóra funcional calazal (MF) y megasporas degenerando (MD) en *P. gaumeri*; escala = 10 μ m. **46.** Megagametofito binucleado de *M. geometrizans*; escala = 25 μ m. **47.** Saco embrionario con células antípodas (flecha) de *P. pringlei*; escala = 25 μ m. **48.** Saco embrionario de *M. geometrizans* mostrando sinérgidas (SI); escala = 25 μ m. **49.** Saco embrionario de *P. pringlei* con ovocélula (OV) y sinérgidas en degeneración (SI); escala = 25 μ m. **50.** Saco embrionario de *P. pringlei* con núcleos polares fusionados (NP) y sinérgidas en degeneración (SI); escala = 25 μ m.



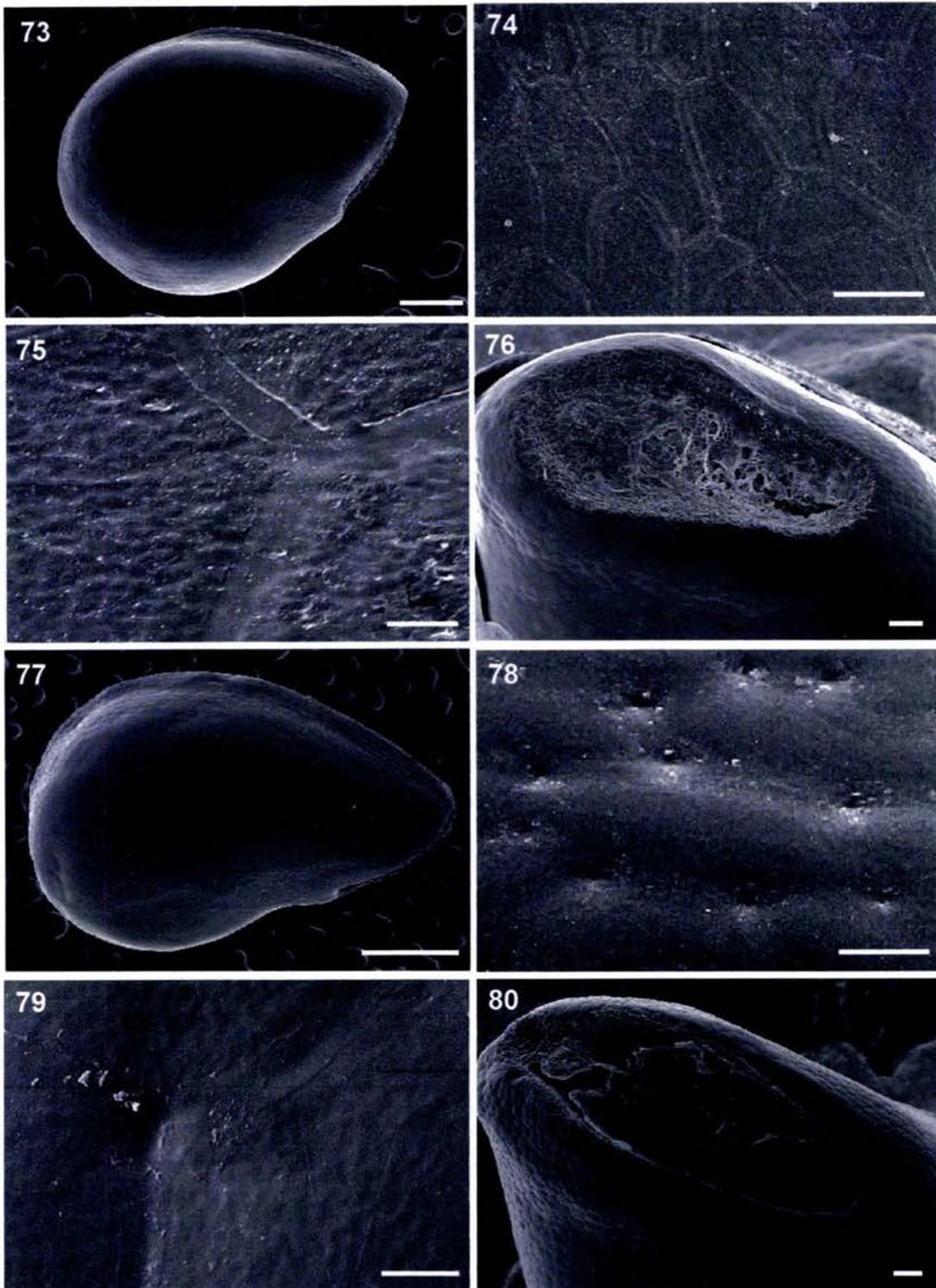
Figuras 51-57. 51. Corte longitudinal de óvulo de *P. gaumeri* con funículo (FU), micrópilo (MI) y cálaza (CA); escala = 100 μm . 52. Micromorfología de óvulo maduro de *P. pringlei* (MEB) mostrando tegumento externo (TE), tegumento interno (TI) y funículo con tricomas (flecha); escala = 100 μm . 53. Detalle de óvulo maduro de *P. pringlei* (MEB) con tegumento externo (TE), tegumento interno (TI) y funículo (FU); escala = 50 μm . 54. Corte longitudinal de óvulo maduro de *P. gaumeri*; nucela (NU), micrópilo (MI), cálaza (CA), espacio aéreo intertegumentario (EA), protuberancia funicular (PF), funículo (FU); escala = 100 μm . 55. Corte longitudinal de óvulo maduro de *M. geometrizzans*; nucela (NU), micrópilo (MI), tegumento externo dorsal (TED), tegumento externo ventral (TEV), cálaza (CA), protuberancia funicular (PF), funículo (FU); escala = 100 μm . 56. Detalle de óvulo maduro de *P. gaumeri* mostrando la entrada del tubo polínico (flecha); tegumento externo (TE), tegumento interno (TI), nucela (NU); escala = 25 μm . 57. Detalle de óvulo en anátesis de *P. fulviceps* en donde se observa un tubo polínico (flecha) y una célula sinérgica (SI); micrópilo (MI), nucela (NU); escala = 25 μm .



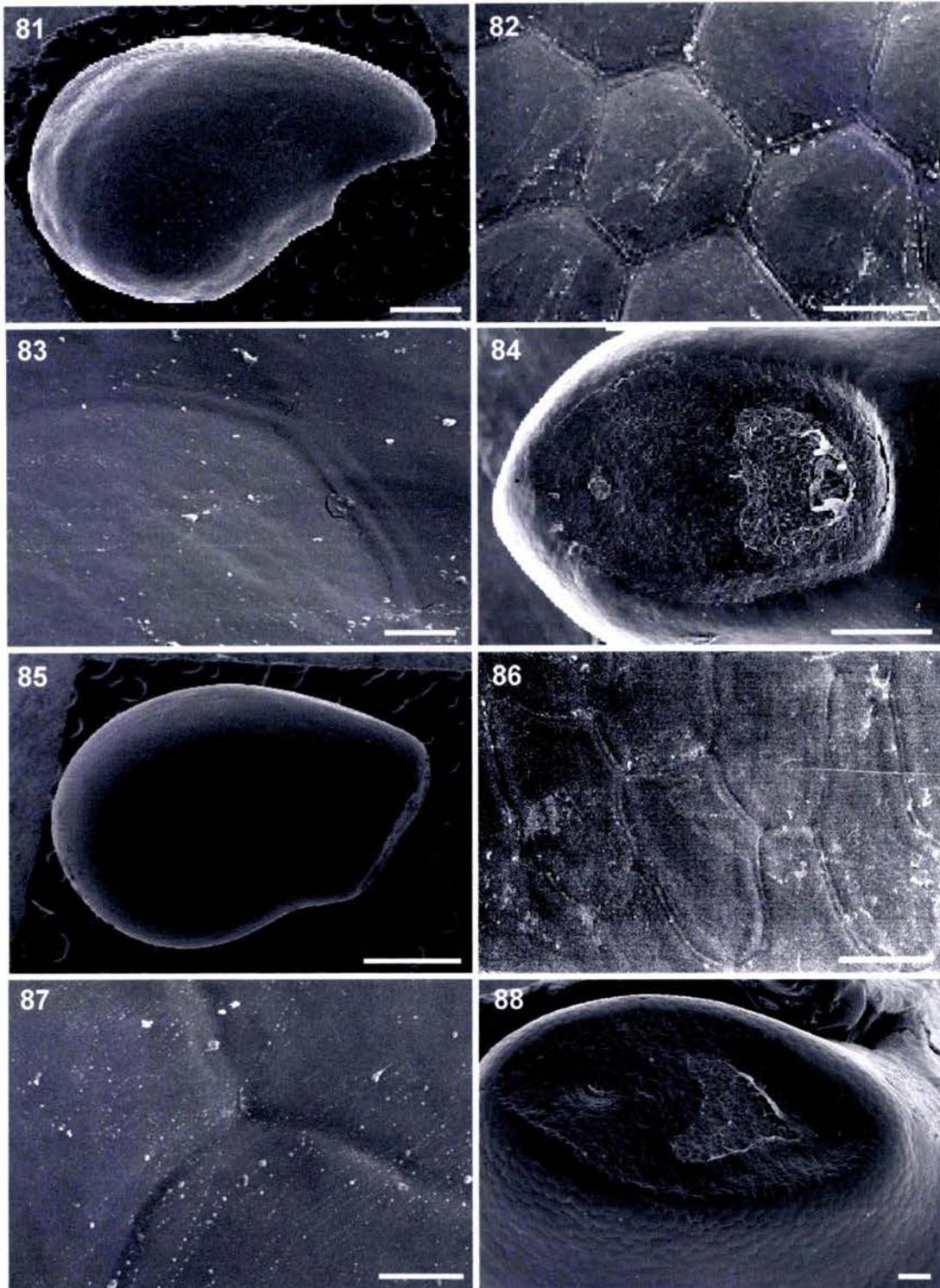
Figuras 58-66. Cortes longitudinales de semilla orientados con la región micropilar hacia la parte inferior. **58.** Fusión de uno de los núcleos espermáticos con los núcleos polares en *P. gaumeri*; núcleo espermático (NE), núcleos polares (NP), vacuola de una sinérgida (VS); escala = 10 μ m. **59.** Cigoto (CI) y sinérgida degenerando (SI) en *P. gaumeri*; escala = 25 μ m. **60.** Primera división del cigoto en *P. fulviceps*; célula apical (CA); célula basal con vacuola (CB); escala = 25 μ m. **61.** Proembrión con división oblicua (flecha) y núcleos del endospermo (ND) de *P. gaumeri*; escala = 25 μ m. **62.** Proembrión tetracelular, sinérgida degenerando (SI) y restos de tubo polínico (flecha) en *P. fulviceps*; escala = 25 μ m. **63.** Embrión columnar de *P. gaumeri*; escala = 25 μ m. **64.** Embrión globular (flecha) y endospermo formando paredes celulares (ED) en *P. gaumeri*; escala = 50 μ m. **65.** Embrión en etapa de corazón con suspensor (flecha) y endospermo celular (ED) en *M. geometrizans*; escala = 25 μ m. **66.** Embrión maduro de *P. gaumeri*; cotiledón (CO), hipocótilo (HI), perispermo (flecha); escala = 500 μ m.



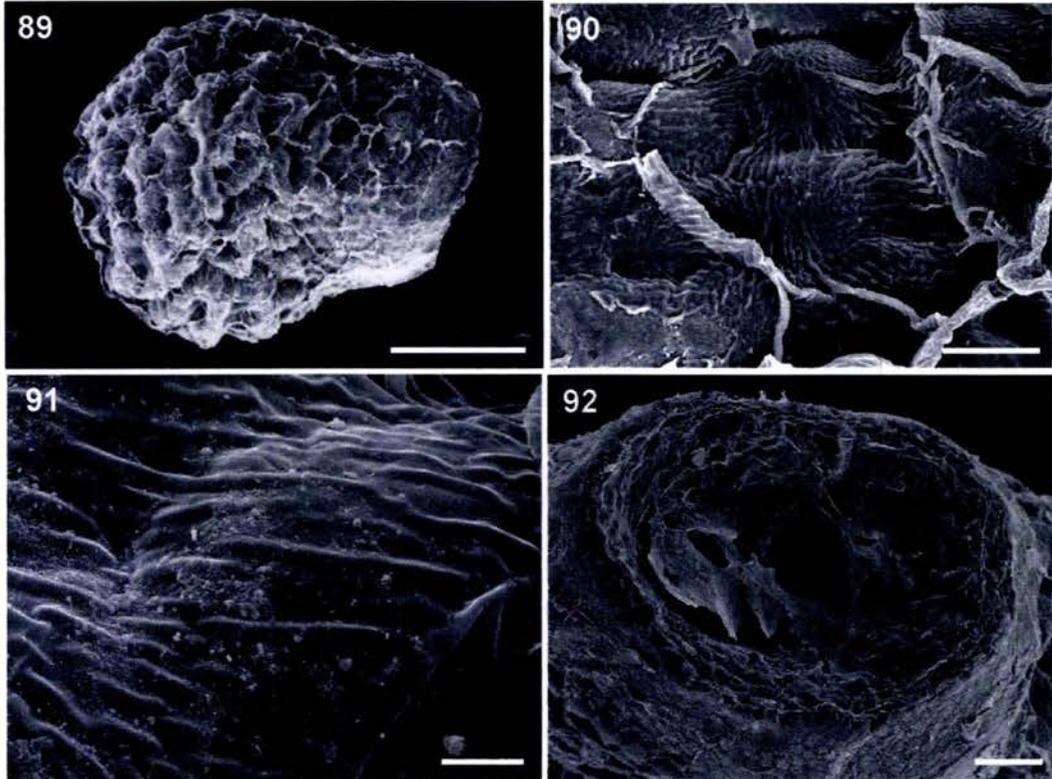
Figuras 67-72. Cortes longitudinales de semilla orientados con la región micropilar hacia la parte inferior. **67.** Endospermo formado por núcleos hipertrofiados rodeados de citoplasma en la región calazal de la semilla en *P. pringlei*; endospermo (ED), nucela (NU); escala = 25 μm . **68.** Hipostasa (flecha) y haz vascular (HV) en *P. pringlei*; escala = 25 μm . **69.** Cubierta seminal de *P. pringlei*; endotegmen (EG), núcleo de una de las células de la exotesta (NE), vacuola con taninos (VT); escala = 25 μm . **70.** Exotesta de *P. militaris*; paredes anticlinales (PA), pared periclinal externa (PE), pared periclinal interna (PI); escala = 25 μm . **71.** Cubierta seminal de *M. geometrizans*; endotegmen con taninos (EG), pared periclinal externa de una de las células de la exotesta (PE), vacuola con taninos de una de las células de la exotesta (VT); escala = 25 μm . **72.** Semilla casi madura de *M. geometrizans*; cotiledón (CO), endospermo (ED), hipocótilo (HI), hilo (HL), procambium (PC), paredes periclinales externas de la exotesta (PE), perispermo (PM); escala = 100 μm .



Figuras 73–76. Micromorfología de la semilla de *P. fulviceps* (MEB). **73.** Semilla vista lateralmente; escala = 500 μm . **74.** Detalle de la cubierta seminal; escala = 50 μm . **75.** Células de la exotesta; escala = 10 μm . **76.** Región hilo micropilar; escala = 100 μm . **Figuras 77–80.** Micromorfología de la semilla de *P. gaumeri* (MEB). **77.** Semilla vista lateralmente; escala = 1 mm. **78.** Detalle de la cubierta seminal; escala = 50 μm . **79.** Células de la exotesta; escala = 10 μm . **80.** Región hilo micropilar; escala = 100 μm .



Figuras 81-84. Micromorfología de la semilla de *P. militaris* (MEB). **81.** Semilla vista lateralmente; escala = 1 mm. **82.** Detalle de la cubierta seminal; escala = 50 μ m. **83.** Células de la exotesta; escala = 10 μ m. **84.** Región hilo micropilar; escala = 500 μ m. **Figuras 85-88.** Micromorfología de la semilla de *P. pringlei* (MEB). **85.** Semilla vista lateralmente; escala = 1 mm. **86.** Detalle de la cubierta seminal; escala = 50 μ m. **87.** Células de la exotesta; escala = 10 μ m. **88.** Región hilo micropilar; escala = 100 μ m.



Figuras 89–92. Micromorfología de la semilla de *M. geometrizans* (MEB). **89.** Semilla vista lateralmente; escala = 100 μm . **90.** Detalle de la cubierta seminal; escala = 50 μm . **91.** Células de la exotesta; escala = 10 μm . **92.** Región hilo micropilar; escala = 500 μm .

que *E. chiotilla*. Las especies de este segundo grupo son consideradas por Gibson y Horak (1978) parte de la subtribu Stenocereinae.

Análisis de componentes principales

Con la técnica de análisis de componentes principales (PCA) se obtuvo una proyección de las especies en un espacio bidimensional de caracteres (Fig. 94).

Los dos conglomerados principales formados en el análisis de UPGMA concuerdan con los grupos que resultan del análisis de componentes principales.

El primer componente principal discrimina entre el grupo formado por *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* y el grupo constituido por *E. chiotilla*, *M. geometrizzans*, *P. chende* y *S. dumortieri*. *Pachycereus marginatus* queda ubicado en una posición intermedia entre ambos grupos. Los caracteres (Cuadro 7) que discriminan los grupos para el primer componente principal son el borde de la región hilo-micropilar, la profundidad de la región hilo-micropilar, la relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo, el tipo de cutícula de la exotesta, la curvatura del embrión, los puntos de separación entre células de la exotesta, el relieve de la pared periclinal externa de la exotesta, la distancia relativa del tegumento externo libre ventral, el ancho de la semilla, el largo de la semilla y la forma de la pared periclinal externa de la exotesta.

El segundo componente principal dispersa las especies del grupo formado por *E. chiotilla* de *M. geometrizzans*, *P. chende* y *S. dumortieri*, mientras que compacta

el grupo de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei*, fundamentalmente por las diferencias o semejanzas en la curvatura de la nucela en el óvulo (Cuadro 7). Este componente principal también contribuye a la separación de *P. marginatus* del resto de las especies de *Pachycereus*.

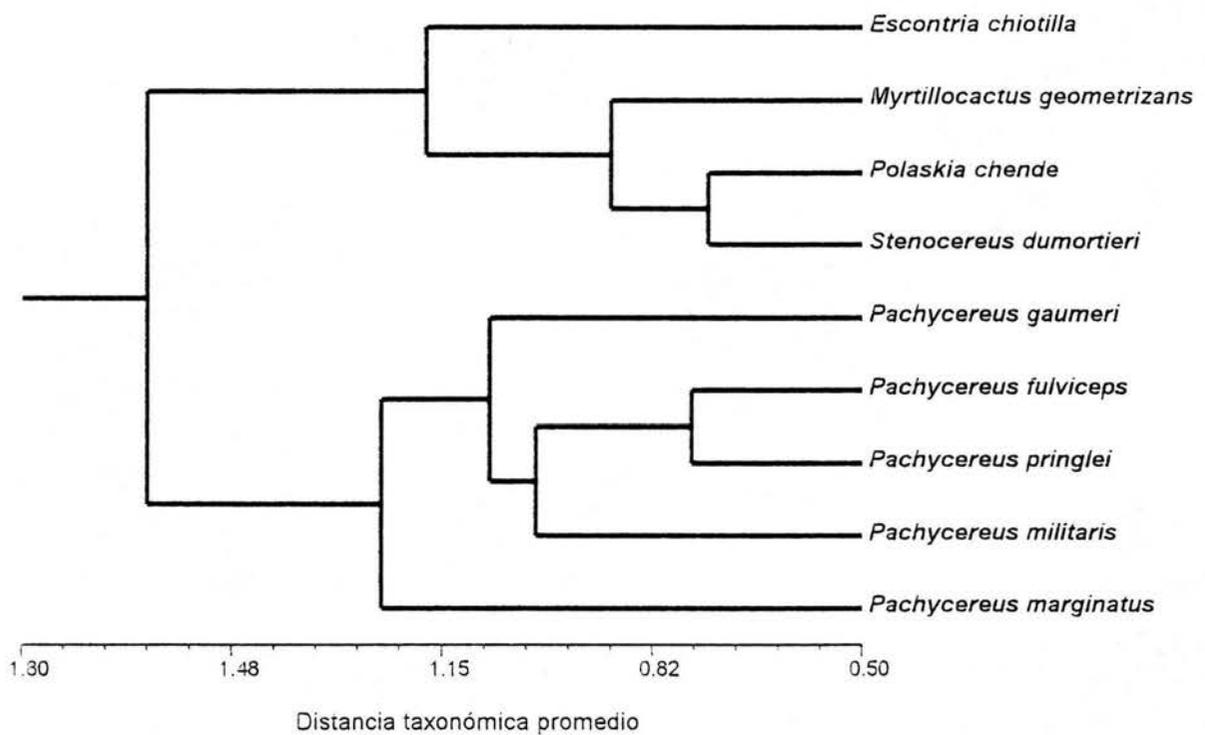


Figura 93. Agrupamiento de nueve especies de Pachycereae por medio de un análisis de conglomerados por el método de UPGMA llevado a cabo a partir de una matriz de distancia taxonómica promedio ($r = 0.785$).

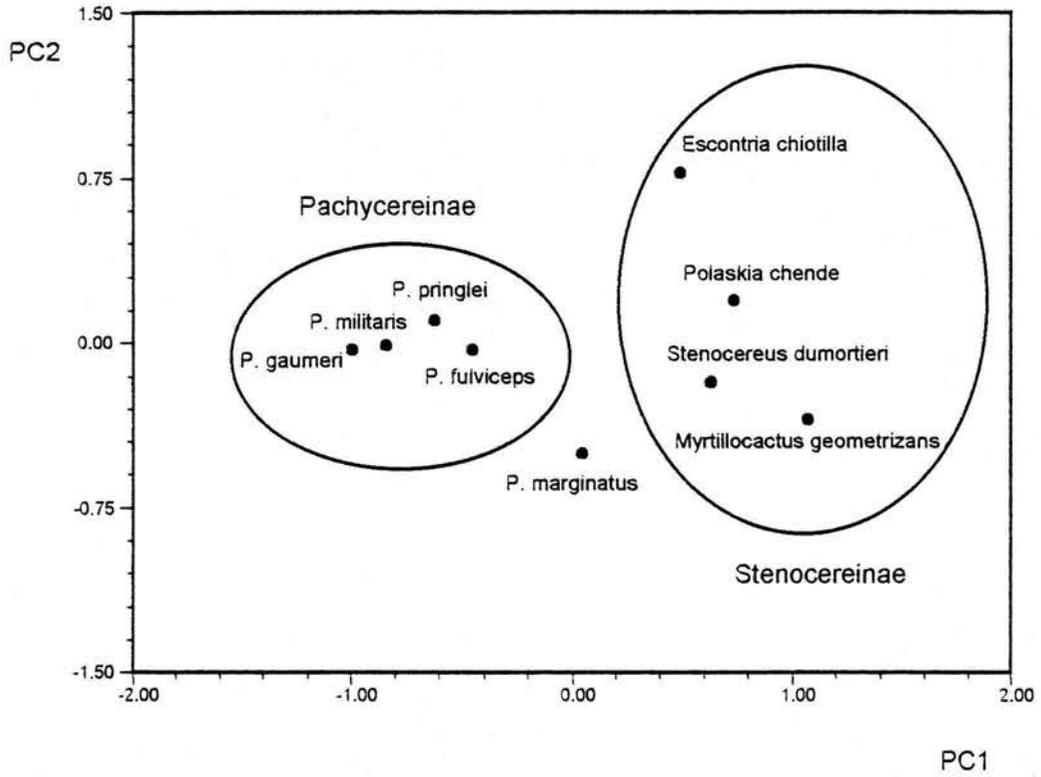


Figura 94. Proyección de nueve especies de la tribu Pachycereae en el espacio de los dos primeros componentes principales.

Cuadro 7. Variación explicada por el análisis de componentes principales y caracteres con mayor peso para los tres primeros componentes principales

COMPONENTE PRINCIPAL	CARACTERES CON MAYOR PESO	VARIACION EXPLICADA	VARIACION ACUMULADA
PC1	Borde de la región hilo-micropilar (0.9604)	57.84	57.84
	Profundidad de la región hilo-micropilar (0.9535)		
	Relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo (0.9333)		
	El tipo de cutícula de la exotesta (0.9054)		
	Curvatura del embrión (-0.9018)		
	Puntos de separación entre tres o más células de la exotesta (0.8992)		
	Relieve de la pared periclinal externa de la exotesta (0.8913)		
	Distancia relativa del tegumento externo libre ventral (0.8562)		
	Ancho de la semilla (-0.8539)		
	Largo de la semilla (-0.8517)		
Forma de la pared periclinal externa de la exotesta (-0.8202)			
PC2	Curvatura de la nucela en el óvulo (0.7879)	13.17	71.01

Discusión

El presente estudio muestra que son muy similares los procesos de desarrollo de óvulos, anteras y semillas en *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*. Entre las principales características que estas especies comparten entre sí, así como con otras cactáceas con respecto al desarrollo de anteras se encuentran la pared de la antera formada por cuatro capas en etapa de células madres de las microsporas (epidermis, endotecio, capa media y tapete), el desarrollo de la pared de la antera de tipo monocotiledóneo, el tapete de tipo secretor, la citocinesis simultánea para dar origen a tétradas tetraédricas, el endotecio con engrosamientos y los granos de polen maduros tricelulares (Neumann, 1935; Tiagi, 1954, 1967, 1970; Kapil y Prakash, 1969;

Flores, 2002; Jiménez, 2002; Orozco, 2002; Strittmatter *et al.*, 2002).

Las características que comparten estas especies con otras cactáceas en relación con el desarrollo de óvulos y semillas son los óvulos de tipo campilótropo, crasinucelados y bitégmicos, el micrópilo formado por el tegumento interno, el espacio aéreo intertegumentario, las antípodas efímeras, el saco embrionario maduro formado por ovocélula, dos sinérgidas y una célula central binucleada, el endospermo de tipo nuclear y la presencia de taninos en la exotesta y el endotegmen de las semillas (Neumann, 1935; Banerji y Sen, 1954; Maheshwari y Chopra, 1955; Chopra, 1957; Engleman, 1960; Tiagi, 1967; Kapil y Prakash 1969; Hernández-García y García-Villanueva, 1991; Flores, 2002; Jiménez, 2002; Orozco, 2002; Strittmatter *et al.*, 2002).

Puesto que se encuentran representadas especies de las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae entre las cactáceas que presentan características embriológicas semejantes, se puede inferir que estos caracteres no solamente son consistentes entre las especies estudiadas en este trabajo, sino también en la familia.

Se han observado tanto tríadas como tétradas de megasporas en cactáceas (Neumann, 1935; Maheshwari y Chopra, 1955; Engleman, 1960; Davis, 1966;

Tiagi, 1967, 1970; Kapil y Prakash, 1969; Johri *et al.*, 1992; Flores, 2002; Jiménez, 2002). Todos los autores coinciden en que el origen del saco embrionario en la familia Cactaceae es monospórico y que la megaspora que le da origen es la calazal, con excepción de Archibald (1939), quien sostiene que el origen del saco embrionario en *Opuntia aurantiaca* es bispórico y que se forma a partir de la célula micropilar de la díada. Posteriormente, Chopra (1957) describe detalladamente el desarrollo del saco embrionario en esta misma especie y concluye que es de origen monospórico, a partir de la megaspora calazal, como en el resto de las cactáceas, de tal manera que la interpretación de Archibald (1939) es errónea, pues confunde con megasporas algunas células de la nucela dispuestas linealmente en posición calazal con respecto a la célula madre de las megasporas.

En *Pachycereus militaris* se observó una tríada con la megaspora funcional en posición calazal y las otras dos células degenerando (Núñez-Mariel *et al.*, 2001).

En *Pachycereus gaumeri* se encontraron tanto tríadas como tétradas de megasporas en óvulos provenientes de una misma flor, además, se observó la segunda división meiótica de la célula micropilar de la díada. Esto sugiere el origen monospórico del saco embrionario en esta especie y que la formación de tríadas es producto de la supresión de la división de la célula micropilar de la díada, como suponen Engleman (1960) y Davis (1966). Esta última característica y la formación de una megaspora funcional en posición calazal, son aspectos importantes para catalogar el origen del saco embrionario de tipo Polygonum, ampliamente referido en los trabajos embriológicos de la familia, pero

escasamente documentado.

Existe controversia para determinar el tipo de óvulo en la familia Cactaceae.

Archibald (1939) definió como circinótrofos a los óvulos de *Opuntia aurantiaca* debido a la particular manera en que los envuelve el funículo, posteriormente este término fue retomado por Tiagi (1954) para *Opuntia dillenii*, por Banerji y Sen (1954) para *Hylocereus undatus* y, para las cactáceas en general, por Davis (1966), Bhojwani y Bhatnagar (1978) y Bouman (1984). Tiagi (1970) considera que la familia Cactaceae puede presentar óvulos campilótrofos, circinótrofos o hemircinótrofos. Johri *et al.* (1992) sostienen que los óvulos en esta familia pueden ser anátropos, hemianátropos, campilótrofos o circinótrofos. Flores y Engleman (1976) argumentan que el término circinótrofo propuesto por Archibald (1939) debe ser utilizado para referirse al funículo y no para describir las características generales del óvulo. En esta investigación se consideró que el tipo de óvulo en *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *M. geometrizaans* es campilótrofo debido a que la nucela es curva y el micrópilo se encuentra en una posición cercana al hilo.

De acuerdo con Johri *et al.* (1992) las semillas de las cactáceas son albuminosas (o endospermicas) y perispermicas. Sin embargo, las semillas maduras de *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *M. geometrizaans* presentan endospermo y perispermo sumamente reducidos ya que las reservas alimenticias se encuentran en el embrión, por lo que deben ser catalogadas como no

albuminosas y no perispérmicas.

Myrtillocactus geometrizans, es la única especie de la subtribu Stenocereinae que se estudió embriológicamente en este trabajo, se distingue por la presencia de taninos en la epidermis de la antera, por el depósito de este mismo compuesto en el tegumento externo del óvulo desde el inicio de la megagametogénesis, así como por la presencia de células funiculares pigmentadas. *Cereus jamacaru*, una cactácea columnar sudamericana perteneciente a la tribu Cereeae, también presenta taninos en la epidermis de la antera (Kapil y Prakash, 1969). Las especies de *Pachycereus* estudiadas, depositan taninos en la epidermis del tegumento externo en el óvulo pero solamente hasta después de la fecundación y en la epidermis de las anteras no se observó este compuesto.

La homogeneidad en la micromorfología del polen de *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *M. geometrizans* concuerda con las observaciones realizadas por Leuenberger (1976) para éstas y otras especies de la tribu Pachycereeae, así como con Gama-López *et al.* (1997) para *Pachycereus grandis*, *P. hollianus*, *P. marginatus*, *P. pecten-aboriginum*, *P. pringlei*, *P. tepamo* y *P. weberi*.

Aunque la mayoría de los caracteres embriológicos son semejantes entre *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *M. geometrizans*, se encontraron diferencias en la anatomía y micromorfología de anteras, óvulos y semillas maduros (Cuadro 8).

Cuadro 8. Síntesis comparativa de caracteres embriológicos de antera, óvulo y semilla en *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*

CARACTERES	<i>P. fulviceps</i>	<i>P. gaumeri</i>	<i>P. militaris</i>	<i>P. pringlei</i>	<i>M. geometrizans</i>
1 Epidermis de la antera	sin taninos	sin taninos	sin taninos	sin taninos	con taninos
2. Curvatura de la nucela en el óvulo	136°	120°	138°	148°	122°
3. Curvatura micropilar en el óvulo	26°	7°	19°	13°	38°
4. Relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo	0.146	0.142	0.152	0.141	0.270
5. Distancia relativa del tegumento externo libre ventral	0.125	0.082	0.131	0.112	0.17
6. Engrosamiento del tegumento externo	hasta el micrópilo	hasta el micrópilo	hasta el micrópilo	hasta el micrópilo	no llega al micrópilo
7. Células pigmentadas en el funículo	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	presentes
8. Curvatura de la nucela en la semilla	167°	218°	231°	171°	136°
9. Curvatura del embrión	182°	216°	233°	194°	120°
10. Razón entre el largo total del embrión y el largo cotiledonar	2.34	3.33	2.38	1.98	2.70
11. Razón entre el largo total del embrión y el ancho del hipocótilo	3.620	3.940	4.300	4.080	3.000
12. Razón entre el área del perispermo y el área nucelar	0.0212	0.0235	0.0084	0.0089	0.0010
13. Razón entre el grosor de la pared periclinal externa de la exotesta y el grosor de las paredes anticlinales	20.90	19.10	8.20	12.30	7.66
14. Taninos en la epidermis del tegumento externo	semilla	semilla	semilla	semilla	desde óvulo
15. Altura celular de la exotesta	homogénea	homogénea	homogénea	homogénea	heterogénea
16. Largo de la semilla	2.7 mm	3.7 mm	5.2 mm	3.2 mm	1.6 mm
17. Ancho de la semilla	2.0 mm	2.6 mm	3.7 mm	2.4 mm	1.3 mm
18. Forma de la semilla	ampliamente ovoide	ampliamente ovoide	ampliamente ovoide	ampliamente ovoide	ovoide
19. Relieve de la pared periclinal externa de la exotesta	plano	plano	plano	plano	convexo
20. Cutícula de la semilla	lisa	lisa	lisa	lisa	estriada
21. Forma de la pared periclinal externa de la exotesta	irregular-alargada	irregular-alargada	hexagonal	irregular-alargada	poligonal
22. Límites celulares de la exotesta	rectos y curvos	rectos y curvos	rectos	rectos y curvos	rectos
23. Relieve de los límites celulares	acanalados	acanalados	elevados	acanalados	estrías perpendiculares
24. Puntos de separación entre tres o más células de la exotesta	indiferenciados	hoyos diminutos	indiferenciados	indiferenciados	hoyos profundos
25. Microrelieve de las paredes periclinales externas de la exotesta	rugoso	verrugoso	diminutamente verrugoso	liso	no evidente
26. Forma de la región hilo-micropilar	ovada (angosta cerca del hilo)	estrechamente ovada	ovada	ovada	elíptica
27. Orientación de la región hilo-micropilar	oblicua	oblicua	oblicua	oblicua	basal
28. Borde de la región hilo-micropilar	no expandido	no expandido	no expandido	no expandido	expandido
29. Profundidad de la región hilo-micropilar	superficial	ligeramente impresa	superficial	superficial	impresa

Los resultados de este trabajo concuerdan con los encontrados por Tobe (1989) para algunas de las familias del orden Myrtales. Este autor sostiene que caracteres como el tipo de tapete, el tipo de desarrollo del megagametofito, el tipo de óvulo o de endospermo, son consistentes a nivel de familia y que los detalles estructurales de la semilla son útiles en niveles menos inclusivos. Palser (1975) y Herr (1984) sugieren que el tamaño y la forma del óvulo, así como del megagametofito, pueden aportar información sistemática relevante en problemas de delimitación genérica o específica.

Tsou (1997), en cambio, obtuvo como parte de sus resultados, que los géneros *Camellia*, *Franklinia* y *Schima* (familia Theaceae) son más diversos embriológicamente que morfológicamente, y que los caracteres relacionados con el desarrollo de la antera son más conservativos que los relativos al desarrollo del óvulo. Entre las principales diferencias que presentan estos géneros entre sí, se encuentran el tipo de óvulo y el tipo de desarrollo del megagametofito.

El análisis de conglomerados realizado en el presente estudio, utilizando exclusivamente caracteres anatómicos y micromorfológicos de óvulos y semillas, coincide con las propuestas taxonómicas que separan a *Pachycereus* de *Myrtillocactus*, *Polaskia*, *Escontria* y *Stenocereus* (Gibson y Horak, 1978; Cornejo y Simpson, 1997; Terrazas y Loza-Cornejo, 2002; Arias, 2002).

Pachycereus fulviceps y *P. pringlei* son las especies que tuvieron óvulos y semillas más parecidos en este género, a pesar de que en el análisis cladístico de evidencia total realizado por Arias (2002), *P. fulviceps* es una de las especies de la subtribu Pachycereinae (*sensu* Gibson *et al.* 1986) que se encuentra menos relacionada filogenéticamente con *P. pringlei*. En el fenograma obtenido en la presente investigación, *P. militaris*, *P. gaumeri* y *P. marginatus* presentan una distancia mayor con *P. pringlei* que la presentada por especies pertenecientes a géneros distintos como es el caso de *M. geometrizzans* y *P. chende* con respecto a *S. dumortieri*.

Los resultados del análisis de componentes principales generados en este trabajo, además de ser consistentes con los resultados del análisis de conglomerados, señalan los caracteres de óvulos y semillas con mayor relevancia para discriminar entre *Pachycereus* y el resto de las especies estudiadas. En *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei*, el relieve de la pared periclinal de la exotesta es plano, la cutícula de la exotesta es lisa y el borde de la región hilo-micropilar es no expandido. Además, estas especies presentan menor largo micropilar, menor largo del tegumento externo libre ventral, mayor curvatura del embrión y mayor largo y ancho de las semillas que *E. chiotilla*, *M. geometrizzans*, *P. chende* y *S. dumortieri*.

En la gráfica de componentes principales, *P. marginatus* se encuentra en una posición intermedia entre los dos grupos principales. Esta especie comparte

valores para el largo y el ancho de las semillas con *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei*, así como, valores para la relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo, para la curvatura del embrión maduro y para la distancia relativa del tegumento externo libre ventral con *E. chiotilla*, *M. geometrizers*, *P. chende* y *S. dumortieri*.

En esta misma gráfica, *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* forman un grupo más compacto que *E. chiotilla*, *M. geometrizers*, *P. chende* y *S. dumortieri*.

La separación entre las especies de Stenocereinae está determinada fundamentalmente por la curvatura de la nucela en el óvulo (carácter con mayor carga para el segundo componente principal). Este carácter tiene un valor de 162° en *E. chiotilla* (valor más alto de *Pachycereus* y Stenocereinae) y de 122° en *M. geometrizers* (valor más bajo de Stenocereinae).

El 50% de los caracteres utilizados en el análisis de componentes principales presentan cargas con valores absolutos mayores o iguales a 0.8. De éstos, 6 caracteres describen la micromorfología de las semillas, 3 son caracteres anatómicos y 2 son las medidas del largo y ancho de las semillas. Estos resultados sugieren que la micromorfología de las semillas provee mayor información taxonómica a nivel interespecífico o intergenérico en la tribu Pachycereeae que los caracteres anatómicos cuantitativos, aunque su valor puede variar en otras tribus o subfamilias dentro de Cactaceae.

La importancia del largo y ancho de las semillas es consistente con los resultados obtenidos por Arias (2002) a partir del análisis de funciones discriminantes para el género *Pachycereus sensu* Barthlott y Hunt (1993).

Los resultados de este análisis concuerdan con Gibson y Horak (1978) en la presencia de cutícula lisa en las semillas de especies pertenecientes a Pachycereinae, así como, cutícula estriada y paredes periclinales externas convexas en la exotesta de las especies de Stenocereinae. Por su parte, la presencia de paredes periclinales externas planas en la exotesta de las especies de *Pachycereus* observadas en esta investigación es consistente con los resultados obtenidos tanto por Gibson y Horak (1978) como por Arias (2002), excepto por *P. marginatus*, pues se consideró que la cubierta seminal tiene paredes ligeramente convexas, aunque Arias (2002) también menciona que observó este tipo de paredes en ciertas zonas de las semillas en esta especie.

En contraste con los resultados de Arias (2002), el análisis de componentes principales aquí generado no muestra que el microrelieve de las paredes periclinales externas de la exotesta sea relevante para discriminar entre las especies estudiadas de Pachycereinae y Stenocereinae. De acuerdo con la presente investigación existe variación para este carácter en las distintas especies estudiadas de *Pachycereus*, pues no todas las paredes tienen microrelieve liso como sostiene Arias (2002), sino que éste también puede ser rugoso, verrugoso o diminutamente verrugoso. Sin embargo, es importante señalar que estas

diferencias pueden deberse a que las observaciones para este carácter fueron realizadas en esta tesis a un aumento mayor que en el estudio llevado a cabo por Arias (2002).

El aspecto "rugoso" de las semillas en Stenocereinae se debe básicamente al tipo de cutícula, al relieve de la pared periclinal externa de la exotesta, a los puntos de separación entre tres o más células en esta misma capa y al microrelieve de la pared periclinal externa de la exotesta.

En los estudios filogenéticos recientes, se ha propuesto que el género que presenta los estados de carácter plesiomórficos para la tribu Pachycereeae es *Stenocereus* (Arias, 2002; Dávila-Aranda *et al.* 2002; Terrazas y Loza-Cornejo, 2002), el cual presenta semillas rugosas en la mayoría de las especies (Gibson *et al.*, 1986). Por lo anterior, podría considerarse que los estados de carácter que conjuntamente dan lugar a la apariencia rugosa de las semillas son plesiomórficos, lo que se contrapone con el supuesto de que *P. gaumeri* es una especie con características ancestrales como lo han planteado Buxbaum (1961) y Gibson y Horak (1978).

Según Bregman (1992), en la subtribu Borzicactinae (tribu Trichocereae *sensu lato*), las semillas verrugosas y grandes, son consideradas plesiomórficas, a diferencia, de las semillas pequeñas y lisas, consideradas apomórficas.

Un siguiente trabajo a desarrollar es determinar si las especies restantes de las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae mantienen el mismo patrón de variación en los caracteres de óvulos y semillas que las especies estudiadas en el presente trabajo. Si esto es así, habría que analizar si estas diferencias representan alguna respuesta adaptativa para la dispersión de las semillas, el establecimiento de las plántulas, la formación de bancos de semillas o de protección ante la desecación o los depredadores.

De acuerdo con los resultados de este estudio, los caracteres relacionados con la esporogénesis, gametogénesis, embriogénesis y endospermogénesis son muy constantes entre *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *M. geometrizzans*, posiblemente debido a que están asociados a la formación de polen, óvulos y semillas viables, pues alguna alteración en estos procesos podría conducir a la formación de individuos con flores unisexuales y esto, en combinación con la interacción con algún polinizador eficiente, podría ser un primer paso para el establecimiento de un sistema sexual que incluyera morfos funcionalmente masculinos o femeninos como probablemente sucedió con *P. pringlei* y *N. mezcalaensis*.

Literatura citada

- Anderson, E. F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press. Portland.
- Archibald, E. E. A. 1939. The development of the ovule and seed of jointed cactus (*Opuntia aurantiaca*, Lindley). *South African Journal of Science* 36: 195-211.
- Arias, S. 2002. Filogenia del género *Pachycereus* (Pachycereeae, Cactaceae). Doctorado en Ciencias. Programa de Botánica. Colegio de Postgraduados. Texcoco.
- Banerji, I. y S. Sen. 1954. A contribution to the cytology and embryology of *Hylocereus undatus* (Haw.) Br. & R. *Bulletin of the Botanical Society of Bengal* 8: 18-23.
- Barthlott, W. y D. R. Hunt. 1993. Cactaceae. En: K. Kubitzki, J. G. Rohwer y V. Bittrich (eds.): *The Families and Genera of Vascular Plants*. Vol. II. Springer-Verlag. Berlin. pp. 161-197.
- Barthlott, W. y D. R. Hunt. 2000. Seed-diversity in the Cactaceae: subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research* 5: 1-173.

- Barthlott, W. y G. Voit. 1979. Mikromorphologie der samenschalen un taxonomie der Cactaceae ein raster-elektronenmikropischer überlick. *Plant Systematic and Evolution* 132: 205-229.
- Bhojwani, S. S. y S. P. Bhatnagar. 1978. The Embryology of Angiosperms. Vikas Publishing House. Delhi.
- Bouman, F. 1984. The ovule. *En*: B. M. Johri (ed.) Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. Berlin. pp. 123-157.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. 2ª ed. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bregman, R. 1992. Seed studies in the subtribe Borzicactinae Buxbaum (Cactaceae; morphology, taxonomy, phylogeny and biogeography. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 114: 201-250.
- Britton, N. L. y J. N. Rose. 1920. The Cactaceae. Vol. 2. Carnegie Institution. Washington D. C.
- Buxbaum, F. 1961. Die Entwicklungslinien der tribus Pachycereae - F. Buxb. *Botanische Studien* 12: 88-107.

Buxbaum, F. 1963. Gattung *Pachycereus*. En: H. Krainz (ed.) Die Kakteen. 15. IV. CIIIb.

Clark, G. 1981. Staining Procedures. Williams & Wilkins. Baltimore.

Cornejo, D. O. y B. B. Simpson. 1997. Analysis of form and function in North American Columnar Cacti (Tribe Pachycereeae). *American Journal of Botany* 84: 1482-1501.

Chopra, R. N. 1957. The mode of embryo sac development in *Opuntia aurantiaca* Lindl.- A reinvestigation. *Phytomorphology* 7: 403-406.

Dávila-Aranda, P., S. Arias-Montes, R. Lira-Saade, J. L. Villaseñor y A. Valiente-Banuet. 2002. Phytogeography of the columnar cacti (tribe Pachycereeae) in Mexico: a cladistic approach. En: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.). *Columnar Cacti and Their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson. pp. 25-41.

Davis, G. L. 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. John Wiley & Sons, Inc. New York.

- Engleman, E. M. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. *American Journal of Botany* 47: 460-467.
- Flores, E. M. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. II Caracteres de valor taxonómico. *Revista de Biología Tropical*. 24: 299-321.
- Flores, E. M. y E. M. Engleman. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. I Desarrollo y estructura. *Revista de Biología Tropical* 24: 199-227.
- Flores, LI. 2002. Estudio embriológico de *Opuntia tomentosa* Salm -Dyck var. *tomentosa* Salm-Dick. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Friedrich, H. y W. Glaetzle. 1983. Seed-morphology as an aid to classifying the genus *Echinopsis* Zucc. *Bradleya* 1: 91-104.
- Gama-López, S., S. Arias-Montes y J. L. Alvarado. 1997. Morfología de los granos de polen de las especies del género *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae). Resúmenes del I Congreso Nacional sobre Cactáceas. Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos, IPN. Montecillo, México.

- Gibson, A. C. y K. E. Horak. 1978. Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 999-1057.
- Gibson, A. C., K. C. Spencer, R. Bajaj y J. L. McLaughlin. 1986. The ever-changing landscape of cactus systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 532-555.
- González, F., P. J. Rudall y C. A. Furness. 2001. Microsporogenesis and systematics of Aristolochiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 137: 221-242.
- Guignard, M. L. 1886. Observations sur les ovules et la fécondation des cactées. *Bulletin de la Société Botanique de France* 33: 276-280.
- Hernández-García, G. y E. García-Villanueva. 1991. Anatomía comparada de óvulos y semillas de dos especies del género *Mammillaria* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 51: 25-38.
- Herr, J. M. J. 1984. Embryology and taxonomy. *En*: B. M. Johri (ed.) *Embryology of angiosperms*. Springer Verlag. Berlin. pp. 647-696.

- Hunt, D. R. (comp.). 1999. CITES Cactaceae Checklist. 2nd ed. Royal Botanic Gardens Kew & International Organization for Succulent Plant Study. Milborne Port.
- Jiménez, K. 2002. Embriología de *Pereskia lychnidiflora* (De Candolle 1828). Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Johri, B. M., K. B. Ambegaokar y P. S. Srivastava. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. New York.
- Kapil, R. N. y N. Prakash. 1969. Embryology of *Cereus jamacaru* and *Ferocactus wislizeni* and comments on the systematic position of the Cactaceae. *Botaniska Notiser* 122: 409-426.
- Leuenberger, B. E. 1976. Die Pollenmorphologie der Cactaceae und ihre Bedeutung für die Systematik. *Dissertationes Botanicae* 31: 1-321.
- Maheshwari, P. y R. N. Chopra. 1955. The structure and development of the ovule and seed of *Opuntia dillenii* Haw. *Phytomorphology* 5: 112-122.
- Media Cybernetics. 1997. Zeiss Image. Version 3.0. Carl Zeiss, Inc. Thornwood.

- Neumann, M. 1935. Die Entwicklung des Pollens, der Samenanlage und des Embryosackes von *Pereskia amapola* var. *argentina*. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 84: 1-30.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994). 1994. SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social). Diario Oficial de la Federación del 16 de mayo de 1994. Tomo CDLXXXVIII. No. 10.
- Núñez-Mariel, C., E. M. Engleman y J. Márquez-Guzmán. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 68: 5-13.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelm (Cactaceae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Palser, B. F. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: embryology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 621-646.
- Rohlf, F. J. 1997. Numerical Taxonomy and Multivariate System. Version 2.00. Exeter Software. New York.

- Rudall, P. J., E. M. Engelman, L. Hanson y M. W. Chase. 1998. Embryology, cytology and systematics of *Hemiphylacus*, *Asparagus* and *Anemarrhena* (Asparagales). *Plant Systematic and Evolution* 211: 181-199.
- Strittmatter, L. I., V. Negrón-Ortiz y J. R. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): Breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* 89: 1373-1387.
- Taylor, N. P. y J. Y. Clark. 1983. Seed-morphology and classification in *Ferocactus* subg. *Ferocactus*. *Bradleya* 1: 3 -16.
- Terrazas, T. y S. Loza-Cornejo. 2002. Phylogenetic relationships of Pachycereeae: a cladistic analysis based on anatomical-morphological data. *En*: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.). *Columnar Cacti and their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson. pp. 66-86.
- Tiagi, Y. D. 1954. Studies in the Floral Morphology of *Opuntia dillenii* Haworth. 1. Development of the ovule and gametophytes. *Botaniska Notiser* 4: 343-356.
- Tiagi, Y. D. 1967. Contribution to the embryology of the genus *Pereskia*. Proceedings 54th Indian Scientific Congress, Part III: Abstracts. Hyderabad.

- Tiagi, Y. D. 1970. Cactaceae. *En*: B. R. Seshachar (ed.). Proceedings of the Symposium on Comparative Embriology of Angiosperms. *Indian National Science Academy Bulletin* 41: 30-35.
- Tobe, H. 1989. The embryology of angiosperms: its broad application to the systematic and evolutionary study. *The Botanical Magazine (Tokio)* 102: 351-367.
- Tsou, C. 1997. Embryology of the Theaceae - anther and ovule development of *Camellia*, *Franklinia* and *Schima*. *American Journal of Botany* 85: 369-381.

CAPITULO IV

Origen de la unisexualidad en *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton & Rose (Cactaceae): un enfoque estructural

Resumen

Pachycereus pringlei es una especie endémica de México con poblaciones trioicas y ginodioicas. Las poblaciones trioicas presentan individuos hermafroditas, femeninos, masculinos y neutros (completamente estériles). Se describe el desarrollo de anteras, óvulos y semillas de las flores bisexuales, femeninas y masculinas. Las flores femeninas y masculinas son bisexuales en el inicio de su desarrollo. A partir de las características embriológicas de las flores unisexuales, se propone que el ancestro de *P. pringlei* fue hermafrodita. En las flores femeninas, las células madres de las microsporas y el tapete comienzan a tener un desarrollo anormal antes de iniciar la meiosis. En las anteras maduras de las flores femeninas, la mayoría de los granos de polen están vacíos y unidos entre sí por las paredes. Las flores de los individuos masculinos generalmente presentan flores con ovarios que contienen funículos pero no óvulos, sin embargo, algunos individuos poseen flores que tienen óvulos con características anormales de la nucela y los tegumentos pero que pueden formar sacos embrionarios estructuralmente normales. Los individuos funcionalmente masculinos que forman óvulos anormales también pueden producir frutos con semillas que presentan irregularidades en la cubierta seminal, pero un embrión maduro con hipocótilo y cotiledones bien formados.

Introducción

El entendimiento de la evolución de los sistemas sexuales en plantas requiere del estudio de la ontogenia de las estructuras reproductoras, así como de los mecanismos fisiológicos y moleculares que dan lugar a la diversidad sexual (Barret, 1998).

Los sistemas de expresión sexual en angiospermas son muy diversos, aunque la mayoría (90%) de las especies son hermafroditas (Charlesworth, 2002). En menor medida (10%) se encuentran las especies que presentan flores unisexuales (Lloyd y Bawa, 1984); entre éstos, el sistema dioico es el más común y lo presentan aproximadamente el 5% de las angiospermas (Charlesworth, 2002). Algunos sistemas combinan plantas con flores unisexuales y plantas con flores bisexuales, siendo las especies androdioicas y trioicas, las más raras (Ainsworth, 2000).

Los sistemas trioicos se caracterizan por la presencia de individuos femeninos, masculinos y hermafroditas (Fleming *et al.*, 1994). Este sistema reproductor se encuentra muy poco documentado. Algunas especies presentan sistemas sexuales polimórficos que no corresponden con la combinación de flores unisexuales y bisexuales que caracteriza las especies trioicas (*Thymelaea hirsuta* (L.) Endl., Thymelaeaceae, El-Keblawy *et al.*, 1996; *Silene acaulis* (L.) Jacq., Caryophyllaceae, Maurice *et al.*, 1998).

Aunque la condición predominante en la familia Cactaceae es la hermafrodita (Parfitt, 1985), se encuentran algunas especies con sistemas sexuales dimórficos o polimórficos. Para la subfamilia Pereskioideae, están reportadas tres especies con flores unisexuales, *Pereskia zinniiflora* DC. con un sistema sexual aparentemente dioico, *P. portulacifolia* (L.) Haw., que podría ser subdioica y *P. quisqueyana* Liogier, en la que solamente se han observado flores masculinas (Leuenberger, 1986).

De acuerdo con Bravo-Hollis (1978), el subgénero *Stenopuntia* (subfamilia Opuntioideae), formado por *Opuntia stenopetala* Engelm., *O. glaucescens* Salm-Dick y *O. grandis* Pfeiff., se caracteriza por la presencia de flores unisexuales. Sin embargo, es importante señalar que Hunt (1999) expresa una opinión taxonómica distinta considerando que *O. glaucescens* y *O. grandis* son sinónimos de *O. stenopetala*. Orozco (2002) describe el desarrollo floral de los morfos sexuales en una población de *O. stenopetala* y llega a la conclusión de que su sistema reproductor es dioico, aunque no descarta la existencia de otras poblaciones con sistemas hermafroditas o ginodioicos.

Existen, además, reportes de la presencia de sistemas sexuales que combinan flores unisexuales con hermafroditas en la subfamilia Opuntioideae. Del Castillo y González-Espinosa (1988) describieron los morfos florales de los individuos masculinos, femeninos y hermafroditas de *Opuntia robusta* J.C. Wendl., encontrando que las flores femeninas presentan anteras atrofiadas sin polen fértil, ovarios con óvulos y estilos cortos con lóbulos estigmáticos; las flores masculinas,

en cambio, presentan anteras con gran cantidad de polen, cavidades del ovario con óvulos atrofiados y estilos largos pero sin lóbulos estigmáticos. Las flores hermafroditas poseen anteras con abundante polen, ovarios con óvulos y estilos de longitud intermedia entre los morfos anteriores. Strittmatter *et al.* (2002) concluyen que el sistema reproductor de *Consolea spinosissima* (Mill.) Lem. es subdioico y que está formado por tres morfos sexuales: femenino, masculino y “débilmente hermafrodita” (flores perfectas que aparentan ser masculinas y con una baja producción de semillas).

En la subfamilia Cactoideae también se encuentran especies con polimorfismo sexual. *Mammillaria neopalmeri* Craig (tribu Cacteae) presenta flores unisexuales y perfectas, aunque no se especifica si el sistema es ginodioico o androdioico (Lindsay y Dawson, 1952). Una población de *Mammillaria dioica* K. Brandegees (tribu Cacteae) fue reportada por Ganders y Kennedy (1978) como ginodioica, aunque también se han observado flores masculinas de esta misma especie en una localidad distinta (Lindsay y Dawson, 1952). *Selenicereus innesii* Kimnach (tribu Hylocereeae) presenta flores bisexuales y pistiladas (Kimnach, 1982). *Echinocereus coccineus* Engelm. (tribu Echinocereeeae) tiene plantas con flores funcionalmente masculinas y plantas con flores funcionalmente femeninas (Hoffman, 1992). *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeb. (tribu Pachycereeae) posee poblaciones androdioicas (Valiente-Banuet *et al.*, 1997).

Pachycereus pringlei (S. Watson) Britton & Rose (tribu Pachycereeae) es una cactácea columnar endémica de México que según Fleming *et al.* (1994) presenta

cuatro morfos sexuales, plantas hermafroditas, plantas masculinas, plantas femeninas y, en proporción muy baja, plantas con flores completamente estériles (neutras). De acuerdo con los mismos autores, las flores femeninas poseen anteras sin polen y las flores masculinas, ovarios sin óvulos o con óvulos muy pequeños. Las poblaciones pueden ser trioicas o ginodioicas dependiendo de su distribución geográfica y no se ha observado variación en el tipo sexual de las plantas a través del tiempo (Fleming *et al.*, 1998).

A partir de la serie de estudios ecológicos y genéticos para comprender la biología reproductora de *P. pringlei* (Fleming *et al.*, 1994, 1998; Murawski *et al.*, 1994; Sosa y Fleming, 1999), se han intentado establecer hipótesis evolutivas con el fin de explicar la coexistencia de plantas hermafroditas y unisexuales, pero no se conocen las causas de la esterilidad femenina y masculina.

El presente trabajo es un estudio comparativo de la embriología de los individuos hermafroditas, masculinos y femeninos de *P. pringlei*. El objetivo es definir el momento de transición del estado bisexual al unisexual en el desarrollo de las flores, y con esto, aportar elementos que permitan entender la ruta evolutiva que ha conducido al polimorfismo sexual en esta especie.

Materiales y métodos

Recolección

Con el objeto de realizar el estudio embriológico de los individuos hermafroditas, femeninos y masculinos de *P. pringlei*, se recolectaron flores y frutos en distintas etapas de desarrollo de cada uno de estos morfos sexuales. La recolección del material se realizó en una localidad del municipio de Hermosillo en el estado de Sonora, México (29° 22' 5" N, 112° 01' 35" W). El tipo de vegetación predominante es matorral bajo con crasicuales. La altitud en esta localidad es de 225 m.s.n.m. El ejemplar de herbario fue depositado en el Herbario Nacional de México (*Arias 1224*). Se obtuvieron muestras de un total de 30 individuos, de los cuales 17 fueron hermafroditas, 9 masculinos y 4 femeninos. Durante la realización del trabajo de campo en esta localidad no se observaron individuos completamente estériles (neutros). Se muestrearon botones florales, flores y frutos representativos del mayor número de etapas posible por cada individuo. Debido a que los tres morfos muestreados no se pueden reconocer por la morfología externa de sus flores, se determinó el sexo de cada individuo observando con lupa la presencia de polen y óvulos en botones florales en preantesis cortados longitudinalmente. Las flores bisexuales presentaron anteras con polen y ovarios con óvulos, las flores femeninas, anteras sin polen y ovario con óvulos, y las flores masculinas, anteras con polen y ovarios sin óvulos o con algunos óvulos amorfos. Se establecieron etapas de desarrollo con base en la longitud de los botones florales. Cada etapa está separada de la siguiente por intervalos de un centímetro en la

longitud del botón floral. Las etapas de desarrollo de las semillas se clasificaron por su color (blanco, crema, café claro y negro).

Técnicas histológicas

Los botones florales, las flores en anthesis y las semillas fueron fijadas en FAA (formaldehído 5% - ácido acético 5% - etanol 63% - agua) y posteriormente deshidratados mediante una serie gradual de etanoles. Las muestras fueron incluidas en Paraplast, JB-4 y LR White. Los bloques de Paraplast fueron cortados con microtomo de rotación a un grosor de 7 a 10 μm y se tiñeron con safranina-verde fijo. Los bloques de JB-4 y LR White se cortaron con un ultramicrotomo RMC-MT998 a un grosor de 1 a 2 μm y se tiñeron con azul de toluidina.

Microscopía electrónica de barrido

Los óvulos y las semillas en distintas etapas de desarrollo fueron procesados para su observación con microscopía electrónica de barrido. Se deshidrataron en etanoles graduales y se llevaron a punto crítico con CO_2 en una desecadora Bal-Tec. Posteriormente, este material fue montado en portamuestras y se cubrió con oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Las observaciones y fotografías se realizaron con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV a 15 Kv y 20 Kv de aceleración de voltaje.

Resultados

Desarrollo de las flores bisexuales

Estas flores presentan anteras bilobuladas y tetrasporangiadas (Fig. 1). Se encuentran drusas en el conectivo. El desarrollo de la pared de la antera es de tipo monocotiledóneo (Fig. 2). La pared de la antera en etapa de célula madre de las microsporas está constituida por epidermis, endotecio, capa media y tapete (Fig. 3). Las células madres de las microsporas se rodean de calosa, aunque presentan puentes citoplásmicos entre ellas hasta el inicio de la meiosis (Fig. 4). Conforme avanza la meiosis, desaparecen los puentes citoplásmicos y la pared de calosa se vuelve continua (Figs. 5 y 6). Las tétradas de microsporas son tetraédricas (Figs. 7 y 8). El tapete presenta dos o más núcleos y es de tipo secretor. Los granos de polen jóvenes presentan una gran vacuola, desplazando el núcleo hacia la periferia (Fig. 9) y se observan los cuerpos de Ubisch en las paredes de las células del tapete (Fig. 10). En esta etapa, los granos de polen ya presentan la ornamentación de la exina, son tricolpados, tectados y espinulados (Fig. 10). Los granos de polen son tricelulares en el momento de su dispersión (Fig. 11). La capa media es efímera y el tapete degenera desde la etapa de granos de polen jóvenes. La pared de la antera madura está formada exclusivamente por un endotecio con engrosamientos en las paredes anticlinales y por la epidermis (Fig. 12).

A partir de la placenta se originan primordios nucelares que comienzan a curvarse y a desarrollar el tegumento interno. El tegumento externo se forma posteriormente. La zona basal del primordio se convierte en el funículo, el cual

crece y se curva conforme avanza el desarrollo del óvulo. Esta curvatura se debe al crecimiento mayor de la parte dorsal del funículo con respecto a la ventral (Fig. 13). El tegumento externo se desarrolla inicialmente sólo en la parte dorsal; en etapas subsecuentes, se desarrolla también la parte ventral, aunque en menor grado (Fig. 14). En la madurez del óvulo, el tegumento externo cubre completamente la nucela y casi totalmente el tegumento interno, de este último queda únicamente al descubierto una parte de la región correspondiente al micrópilo (Fig. 15). El funículo presenta tricomas en la región ventral y rodea parcialmente el óvulo. Los óvulos son campilótrpos, bitégmicos y crasinucelados. El megagametofito es octanucleado y heptacelular. Presenta tres células antípodas efímeras, una célula central con dos núcleos polares, una ovocélula y dos células sinérgidas. Las células sinérgidas se caracterizan por poseer un citoplasma muy denso, una vacuola calazal y un aparato filiforme. Los núcleos polares se fusionan antes de la fecundación.

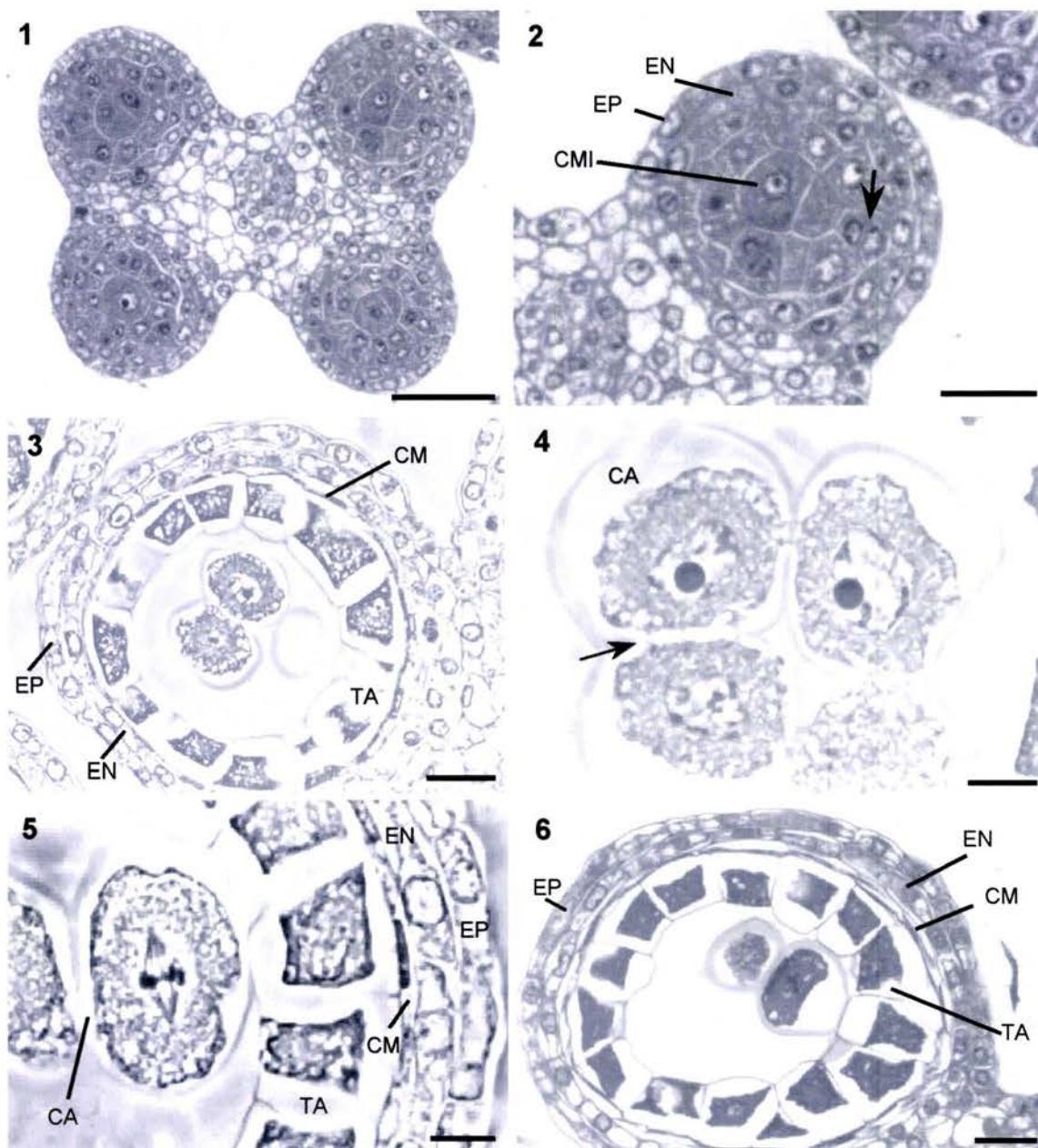
Los tubos polínicos se desplazan por el tejido de transmisión del estilo. La fecundación es porógama. El embrión en etapa globular presenta suspensor y continúa su desarrollo pasando por las etapas de corazón y torpedo antes de alcanzar la madurez. El embrión maduro presenta una curvatura mayor de 180°. Los cotiledones tienen casi la mitad de la longitud total del embrión (Fig. 16). El tipo de desarrollo del endospermo es nuclear. La exotesta y el endotegmen se impregnan de taninos y cubren completamente el embrión. La exotesta es la principal capa mecánica de la cubierta seminal, las paredes periclinales de sus

células se engruesan y contienen una vacuola con taninos que ocupa todo el espacio que inicialmente ocupaba el citoplasma. Las semillas maduras presentan simetría bilateral y tanto el hilo como el micrópilo, debido a la curvatura del óvulo, se encuentran en posiciones cercanas, formando la región hilo-micropilar (Figs. 17 y 18).

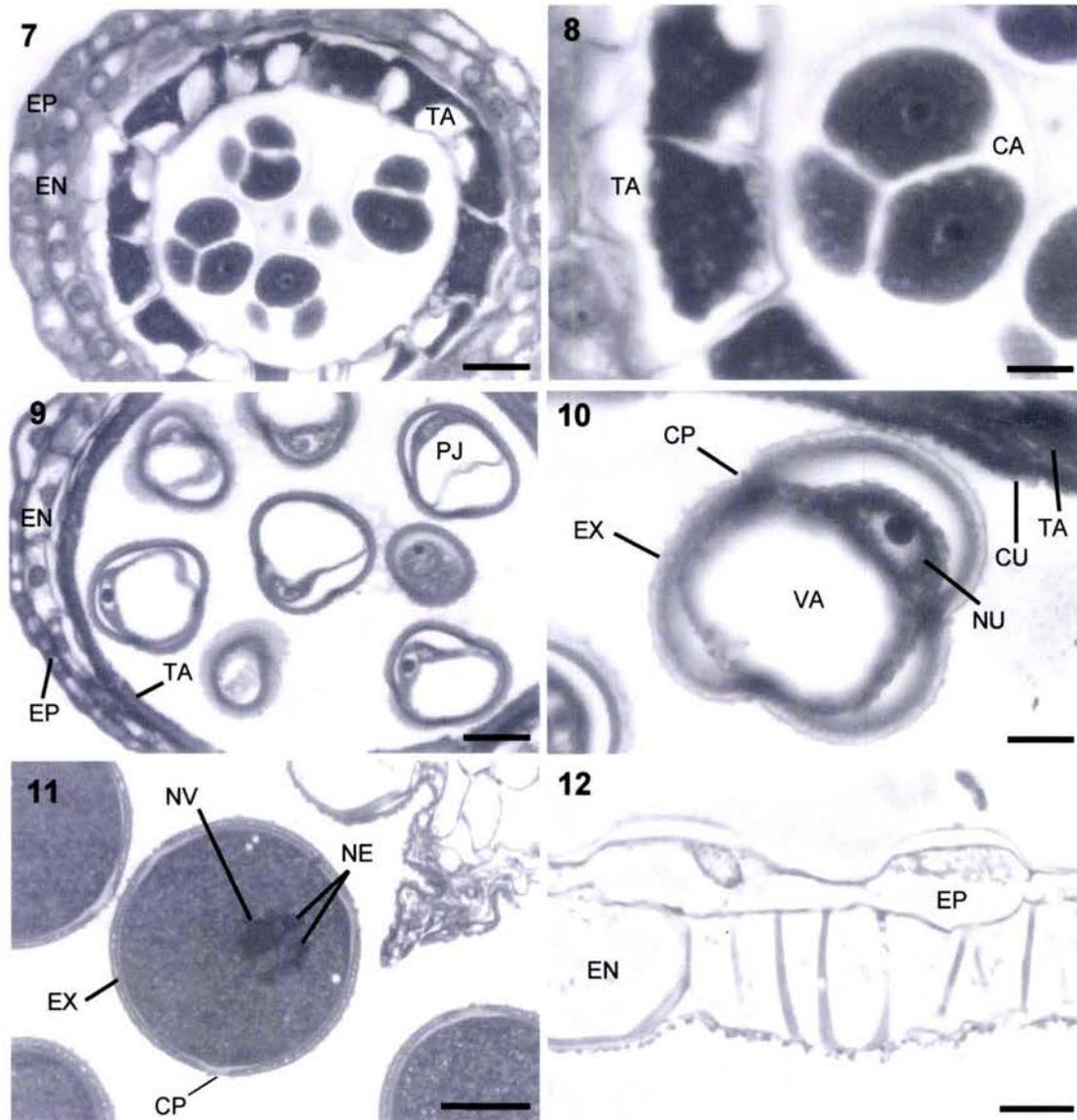
Desarrollo de las anteras en las flores femeninas

Las flores femeninas son bisexuales en las etapas tempranas de desarrollo. Las anteras son bilobuladas, tetrasporangiadas y presentan drusas en el conectivo, al igual que las anteras de las flores bisexuales y masculinas. Las células madres de las microsporas, tienen una apariencia normal y la pared de la antera está formada por el tapete, una capa media, el endotecio y la epidermis.

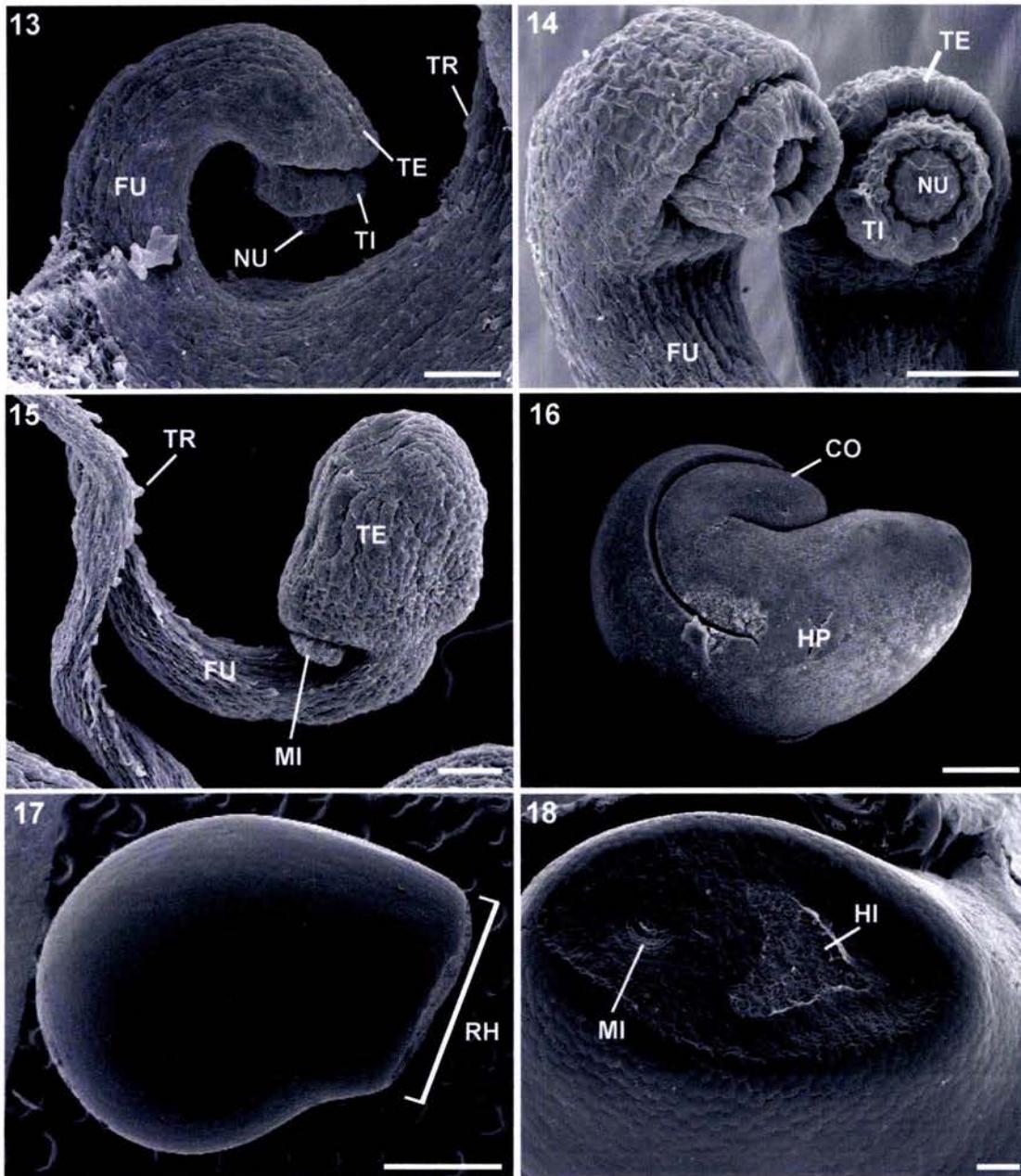
Se observaron diferencias en el desarrollo cuando las células madres de las microsporas se rodean de calosa. Aunque en esta etapa, las cuatro capas que forman la pared de la antera tienen una apariencia normal (Fig. 19), la calosa que rodea las células madres de las microsporas adquiere una forma irregular (Fig. 20) que no se observa en las anteras fértiles. Algunas zonas de esta pared de calosa son sumamente delgadas (Fig. 21). La presencia de canales citoplásmicos entre células madres de las microsporas de las flores femeninas es más evidente que en las flores bisexuales; incluso, en algunos pares de células madres de las microsporas, es casi imperceptible la pared de calosa que las separa (Fig. 22). En este momento, las células del tapete son binucleadas como en las anteras fértiles (Fig. 22).



Figuras 1-6. Cortes transversales de anteras de flores bisexuales. 1. Antera inmadura bilobulada y tetrasporangiada, escala = 50 μm . 2. Microsporangio mostrando la división de la capa parietal secundaria interna (flecha), escala = 25 μm . 3. Microsporangio con células madres de las microsporas, escala = 25 μm . 4. Células madres de las microsporas rodeadas de calosa mostrando puentes citoplásmicos (flecha), escala = 10 μm . 5. Detalle de la metafase I de las células madres de las microsporas, escala = 10 μm . 6. Microsporangio con células madres de las microsporas en la primera división meiótica, escala = 25 μm . Calosa (CA), capa media (CM), célula madre de la microsporas (CMI), endoteco (EN), epidermis (EP), tapete (TA).



Figuras 7-12. Cortes transversales de anteras de flores bisexuales. **7.** Microsporangio con tétradas de microsporas, escala = 25 μm . **8.** Tétrada tetraédrica de microsporas y algunas células tapetales, escala = 10 μm . **9.** Microsporangio con granos de polen jóvenes, escala = 50 μm . **10.** Grano de polen joven mostrando vacuola, núcleo, exina espinulada y colpos. Algunos cuerpos de Ubisch se encuentran en la pared de una célula tapetal, escala = 10 μm . **11.** Grano de polen maduro mostrando exina, colpos, el núcleo de la célula vegetativa y los núcleos de las células espermáticas, escala = 25 μm . **12.** Pared de antera madura formada por epidermis y endotecio con engrosamientos en las paredes anticlinales, escala = 10 μm . Calosa (CA), colpo (CP), cuerpos de Ubisch (CU), endotecio (EN), epidermis (EP), exina (EX), grano de polen joven (PJ), núcleos espermáticos (NE), núcleo (NU), núcleo vegetativo (NV), tapete (TA), vacuola (VA).



Figuras 13-18. Micromorfología de óvulos y semillas de individuos hermafroditas (MEB). **13.** Ovulo inmaduro, escala = 50 μm . **14.** Ovulos inmaduro, escala = 50 μm . **15.** Ovulo de flor en antesis, escala = 100 μm . **16.** Embrión maduro, escala = 500 μm . **17.** Semilla madura, escala = 1 mm. **18.** Región hilo-micropilar, escala = 100 μm . Cotiledón (CO), funículo (FU), hilo (HI), hipocótilo (HP), micrópilo (MI), nucela (NU), tegumento externo (TE), tegumento interno (TI), tricomas (TR), región hilo-micropilar (RH).

El lóculo de algunas anteras contienen células con apariencia de microsporas que se caracterizan por la presencia de citoplasma denso rodeado por exina (Fig. 23). En estas anteras se observaron células del tapete hipertrofiadas con forma irregular e invadiendo el lóculo (Fig. 24).

Los granos de polen jóvenes presentan formas irregulares (Fig. 25) y su citoplasma contiene una gran vacuola que desplaza el núcleo hacia la periferia. Las paredes de los granos de polen en esta etapa tienen adheridos numerosos depósitos globulares (posiblemente de esporopolenina) provenientes del tapete (Fig. 26). En algunos casos, estas paredes están compuestas, tanto por zonas engrosadas por las estructuras globulares, como por zonas incompletas (Fig. 27). La pared de la antera en esta etapa está formada por la epidermis, el endotecio, la capa media con células muy delgadas y el tapete que comienza a desintegrarse (Fig. 28).

En etapas subsecuentes, muchos de los granos de polen sólo presentan restos de citoplasma (Fig. 29 y 30) y las zonas incompletas de las paredes de algunos de ellos permiten la salida del citoplasma hacia el lóculo de la antera (Fig. 31). Por su parte, la pared de la antera ya no tiene capa media, pero todavía es posible observar el tapete con paredes celulares y restos de citoplasma, el endotecio que comienza a formar engrosamientos y la epidermis (Fig. 32).

Los lóculos de las anteras de los botones florales en preantesis presentan masas de paredes de granos de polen unidas entre sí (Figs. 33 y 34). En ocasiones

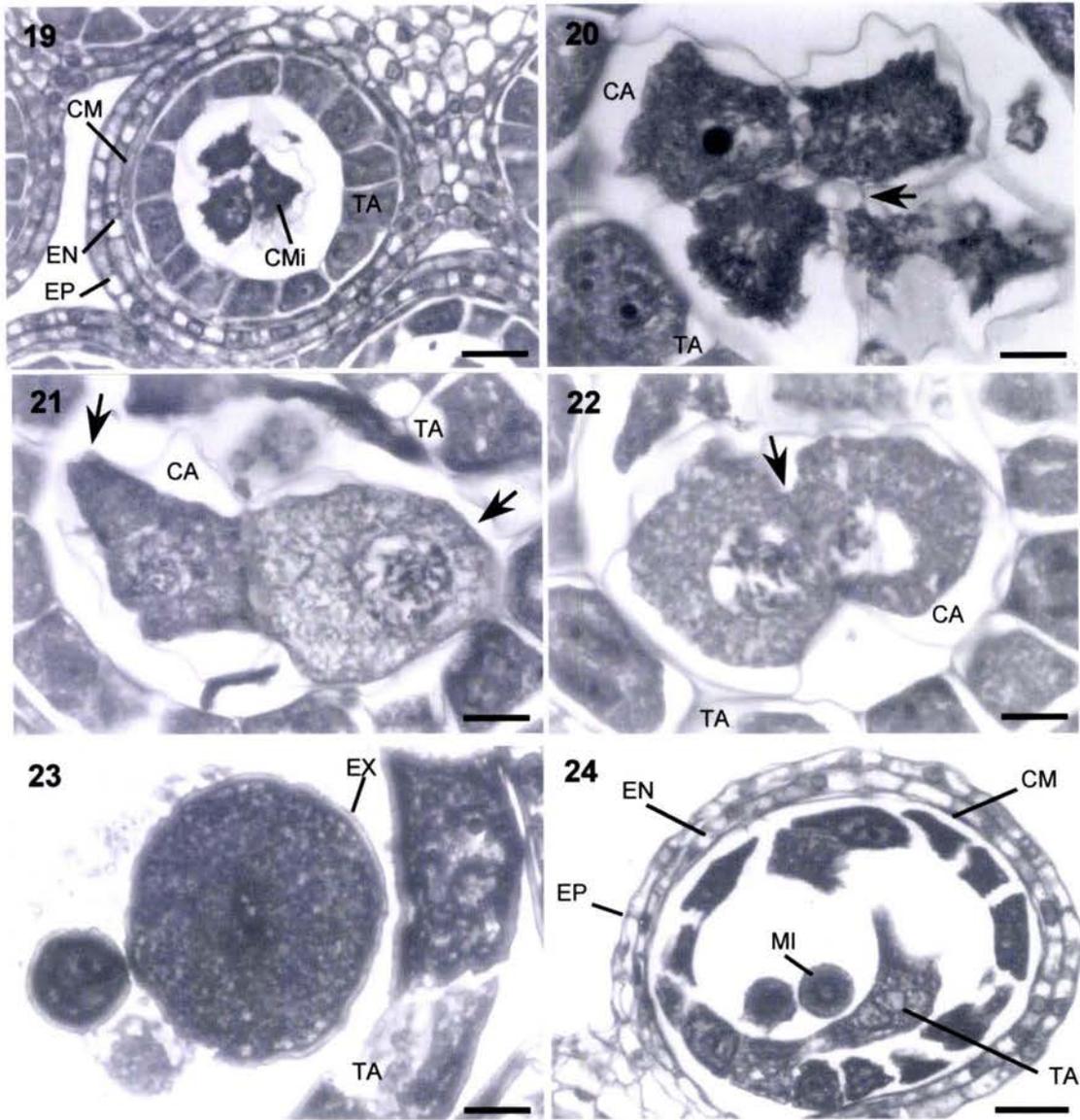
también se pueden encontrar granos de polen hipertrofiados con citoplasma (Fig. 35). La pared de la antera en esta etapa está constituida por epidermis, endotecio y las paredes celulares del tapete (Fig. 36).

Desarrollo de óvulos y semillas en los individuos masculinos

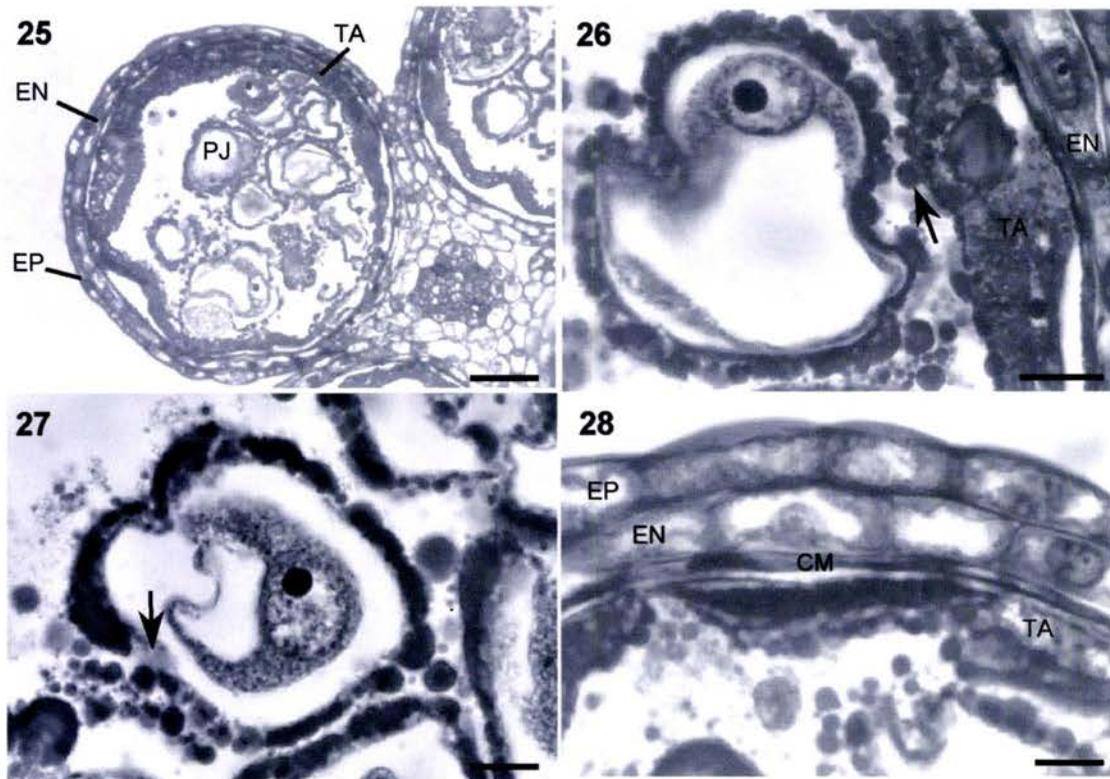
Se identificaron dos tipos de flores en los individuos masculinos, ambos con ovario, estilo y estigma bien desarrollados. En un tipo, el ovario de las flores en antesis solamente contienen funículos que terminan en varias protuberancias nucelares que no desarrollan tegumentos (Fig. 37). En el otro tipo, el ovario contiene óvulos amorfos en los que la nucela está cubierta parcial o completamente por los tegumentos (Fig. 38) y funículos que no presentan estas estructuras, ni protuberancias nucelares como en el primer tipo floral descrito.

En la mayoría de los óvulos amorfos observados en etapas tempranas de desarrollo se puede observar la nucela, el tegumento interno y el tegumento externo, pero en algunos casos, la nucela o uno de los tegumentos no son evidentes (Figs. 39 y 40).

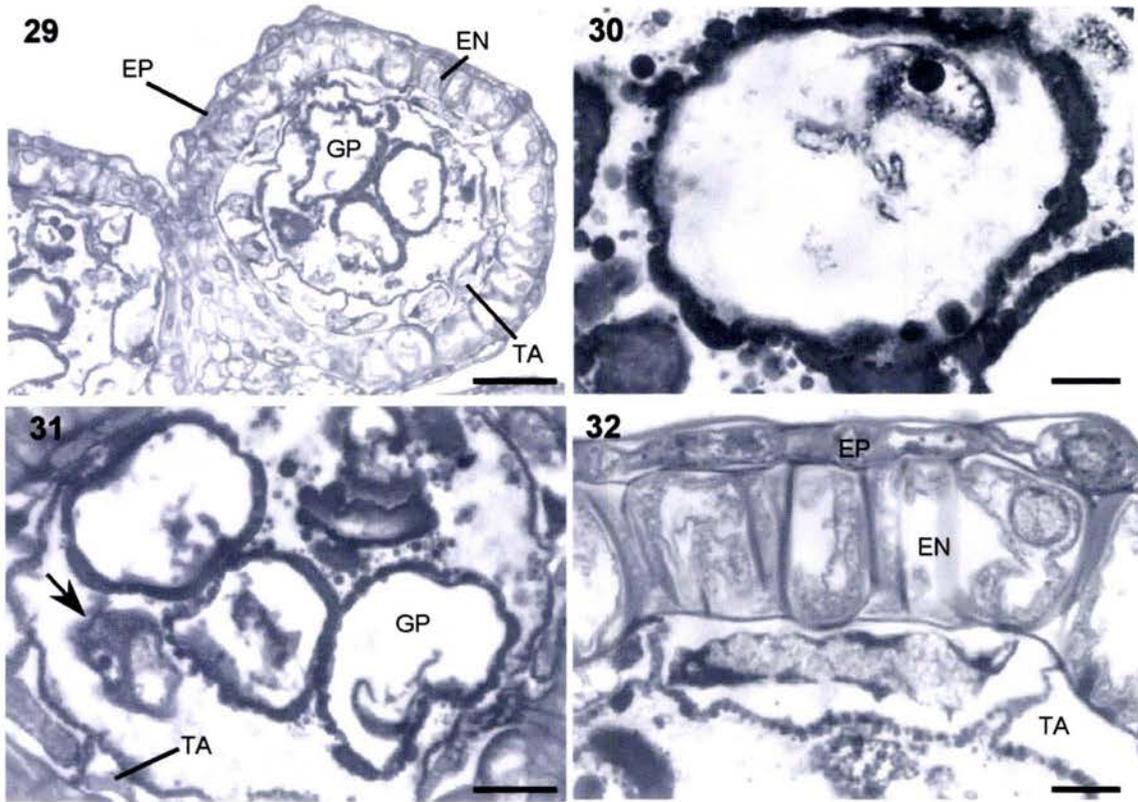
Como consecuencia del desarrollo irregular, tanto de la nucela como de los tegumentos, las flores masculinas en antesis tienen óvulos con una morfología completamente distinta a la que presentan los óvulos de las flores bisexuales y femeninas. El tegumento externo no completa su desarrollo y sólo cubre parcialmente a la nucela, mientras que el tegumento interno puede cubrir totalmente a la nucela o puede dejar descubierto su ápice (Fig. 41). Los óvulos



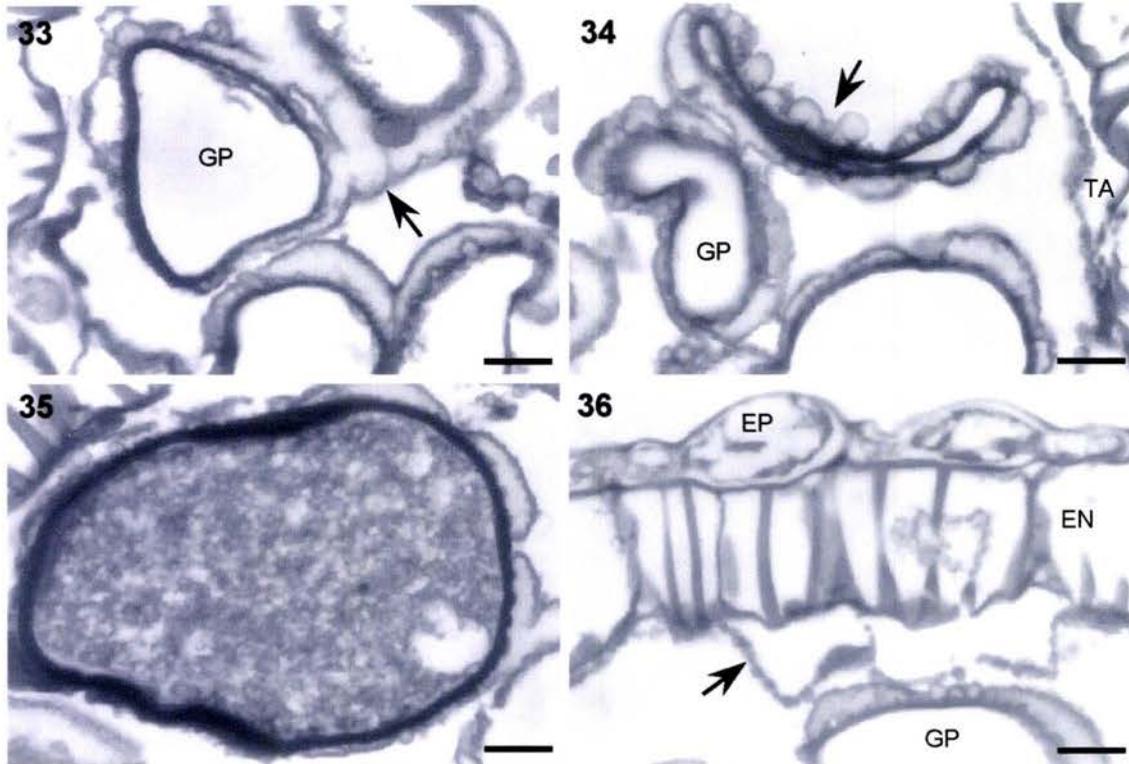
Figuras 19-22. Cortes transversales de antera en un botón floral femenino en etapa de células madres de las microsporas. **19.** Microsporangio con células madres de las microsporas rodeadas de calosa, escala = 25 μm . **20.** Células madres de las microsporas rodeadas de una pared irregular de calosa con puentes citoplásmicos (flecha), escala = 10 μm . **21.** Células madres de las microsporas con zonas de la pared de calosa muy delgadas (flecha), escala = 10 μm . **22.** Células madres de las microsporas unidas por puentes citoplásmicos (flecha), escala = 10 μm . **Figuras 23-24.** Cortes transversales de antera en un botón floral femenino en etapa de microsporas. **23.** Microspora y células tapetales, escala = 10 μm . **24.** Microsporangio mostrando microsporas y el tapete invadiendo el lóculo, escala = 25 μm . (CA) calosa, (CM) capa media, (CMi) célula madre de las microsporas, (EN) endotecio, (EP) epidermis, (EX) exina, (MI) microspora, (TA) tapete.



Figuras 25-28. Cortes transversales de antera en un botón floral femenino en etapa de granos de polen jóvenes. **25.** Microsporangio con granos de polen jóvenes amorfos, escala = 50 μm . **26.** Grano de polen joven amorfo con depósitos globulares en la pared y tapete liberando glóbulos (flecha), escala = 10 μm . **27.** Grano de polen joven amorfo con pared incompleta (flecha), escala = 10 μm . **28.** Detalle de la pared de la antera, escala = 10 μm . (CM) capa media, (EN) endotecio, (EP) epidermis, (PJ) grano de polen joven, (TA) tapete.



Figuras 29-32. Cortes transversales de antera con granos de polen degenerando en un botón floral femenino. **29.** Microsporangio con granos de polen mostrando restos de citoplasma, escala = 50 μm . **30.** Grano de polen con restos de citoplasma y núcleo, escala = 10 μm . **31.** Lóculo con granos de polen degenerando y citoplasma libre (flecha), escala = 25 μm . **32.** Pared de la antera con epidermis, endotecio y tapete, escala = 10 μm . (EN) endotecio, (EP) epidermis, (GP) grano de polen, (TA) tapete.



Figuras 33-36. Cortes transversales de antera en un botón floral femenino en preantesis. **33.** Granos de polen vacíos con paredes unidas (flecha), escala = 10 μm . **34.** Granos de polen vacíos con glóbulos adosados a la pared (flecha), escala = 10 μm . **35.** Grano de polen amorfo e hipertrofiado con citoplasma, escala = 10 μm . **36.** Detalle de la pared de antera con epidermis, endotecio y paredes celulares del tapete (flecha), escala = 10 μm . (EN) endotecio, (EP) epidermis, (GP) grano de polen.

presentan variación, tanto en el grado de curvatura de la nucela, como en su orientación, que en ciertos casos es opuesta (Fig. 41) a la que tienen los óvulos de las flores bisexuales, los cuales siempre dirigen el ápice de la nucela hacia el funículo.

A pesar del desarrollo anormal de los óvulos de las flores masculinas, en uno de ellos fue observado un saco embrionario con una ovocélula y dos células sinérgidas (Fig. 42), de manera similar a los que se encuentran en las flores bisexuales, así como, un núcleo secundario, producto de la fusión de los núcleos polares de la célula central (Fig. 43). Esto implica que aunque la morfología de estos óvulos esté alterada, es posible que el saco embrionario pueda desarrollarse normalmente.

Es frecuente la producción de frutos en los individuos considerados como masculinos, éstos generalmente son abortivos y no forman semillas, pero algunos individuos pueden contener unas cuantas semillas con características irregulares o estar repletos de ellas.

Muchas de las semillas inmaduras con un desarrollo anormal, poseen una nucela muy larga, generalmente cubierta por el tegmen, pero debido a que el tegumento externo no completa su desarrollo en los óvulos, la testa sólo cubre la nucela y al tegmen parcialmente (Fig. 44). En una de estas semillas, se encontró un embrión en etapa de torpedo perfectamente formado, rodeado por el endospermo con paredes celulares en formación, la nucela con unos cuantos estratos celulares y el

tegmen conteniendo taninos (Fig. 45), de manera similar a las semillas de los individuos hermafroditas en esta etapa.

Las semillas anormales de los individuos masculinos pueden alcanzar la madurez y presentar una morfología muy diversa, pero es frecuente que contengan embriones de talla similar a la correspondiente a los embriones maduros de los individuos hermafroditas, aunque con distintos grados de curvatura. El tamaño de la testa puede variar pero generalmente está cubriendo parcialmente el embrión en la zona de los cotiledones (Figs. 46 y 47), aunque también se han observado algunas semillas con una testa sumamente reducida o, definitivamente, careciendo de ella. La micromorfología de las células de la testa de las semillas anormales y normales son semejantes, presentan paredes periclinales externas de forma irregular, planas y con límites tanto rectos como curvos (Fig. 48).

A pesar del desarrollo incompleto de la testa, los embriones no están completamente desnudos, sino que se encuentran envueltos por el tegmen (Fig. 49). Debido al crecimiento desigual de los tegumentos, el micrópilo (Fig. 50) y el hilo (Fig. 51) no se ubican en posiciones cercanas formando la región hilo-micropilar, como sucede en los individuos hermafroditas.

Los embriones maduros están formados por dos cotiledones, hipocótilo y radícula. La relación entre el tamaño de los cotiledones y el largo total del embrión es muy variable, incluso dentro de un mismo fruto se pueden encontrar embriones completamente rectos o con formas irregulares (Figs. 52 y 53).

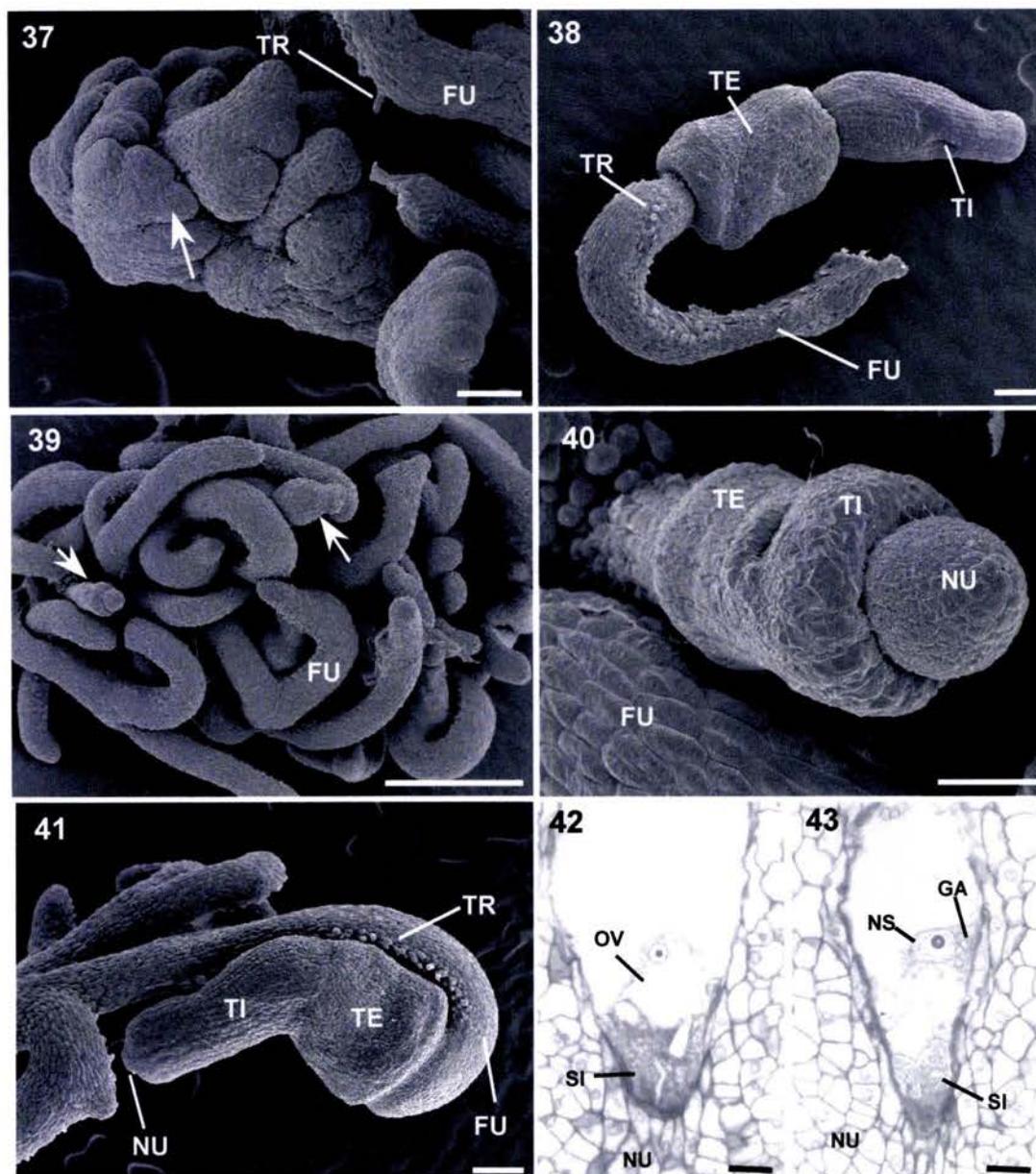


Figura 37. Micromorfología de funículos con protuberancias nucelares (flecha) en una flor masculina en antesis (MEB), escala = 100 μ m. **Figura 38.** Micromorfología de un óvulo en una flor masculina en antesis mostrando el tegumento externo y el tegumento interno (MEB), escala = 500 μ m. **Figura 39.** Micromorfología de óvulos en una etapa temprana de desarrollo (flecha) en un botón floral masculino (MEB), escala = 500 μ m. **Figura 40.** Acercamiento de uno de los óvulos inmaduros de la Fig. 39, mostrando los primordios de los tegumentos (MEB), escala = 50 μ m. **Figura 41.** Óvulo maduro de una flor masculina en antesis en donde se observa el tegumento externo, el tegumento interno y el ápice de la nucela (MEB), escala = 100 μ m. **Figuras 42-43.** Cortes longitudinales de óvulos de flores masculinas en antesis. **42.** Saco embrionario con ovocélula y sinérgidas, escala = 25 μ m. **43.** Saco embrionario mostrando a la célula central con núcleo secundario y granos de almidón, escala = 25 μ m. (FU) funículo, (GA) granos de almidón, (NU) nucela, (NS) núcleo secundario, (OV) ovocélula, (SI) sinérgida, (TE) tegumento externo, (TI) tegumento interno, (TR) tricomas.

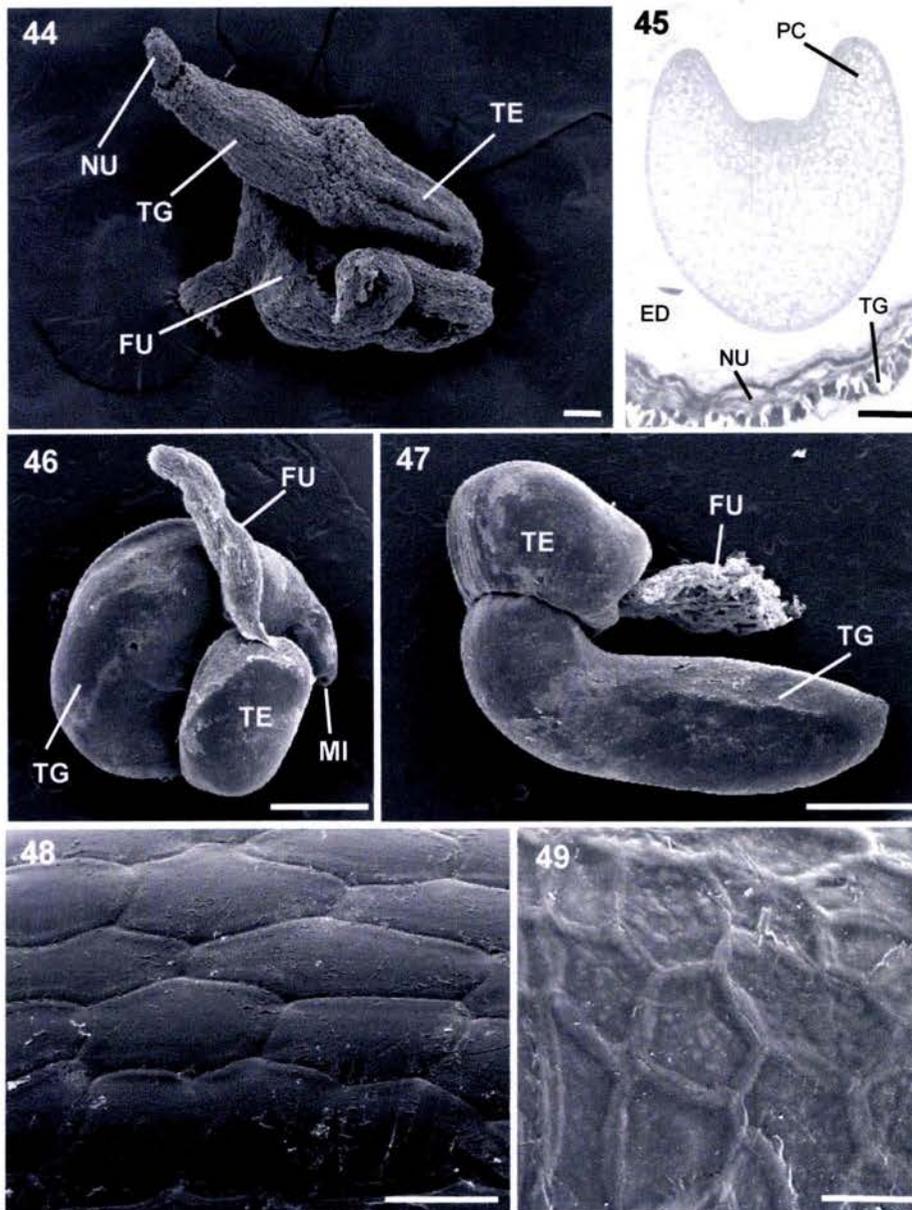
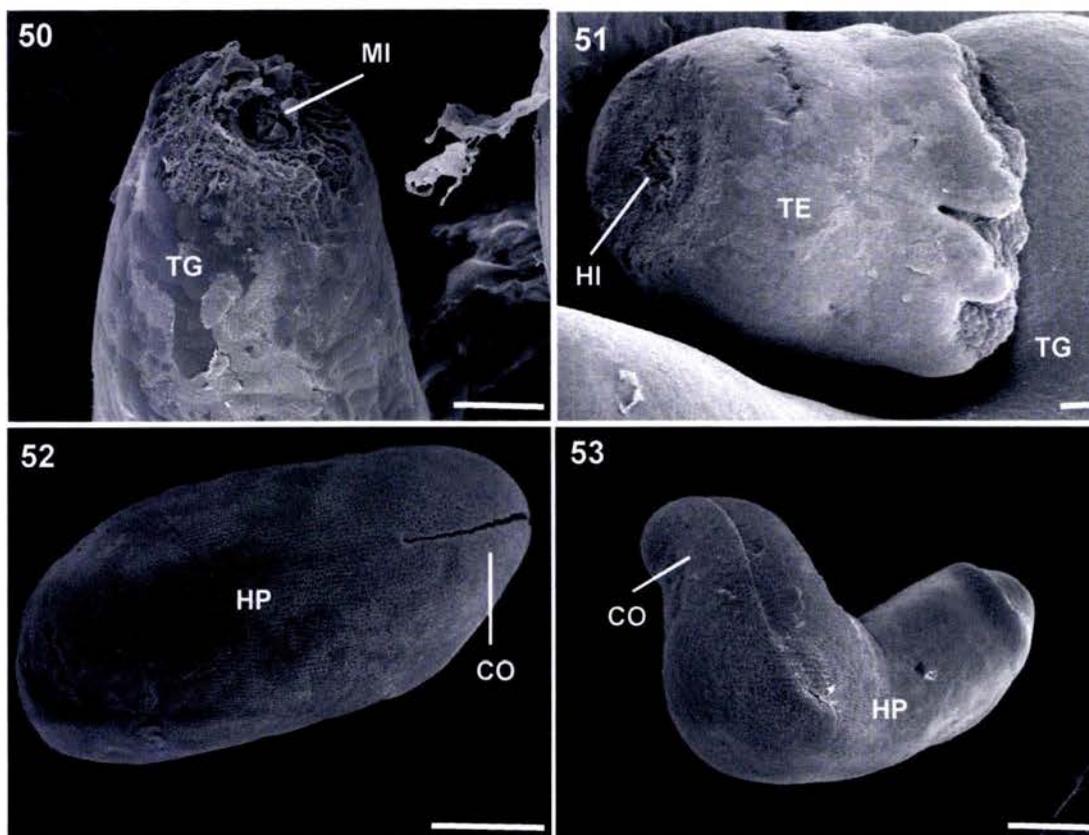


Figura 44. Micromorfología de semilla amorfa inmadura con la nucela cubierta casi completamente por el tegmen y parcialmente por la testa (MEB), escala = 100 μm . **Figura 45.** Corte longitudinal de semilla amorfa inmadura mostrando un embrión en etapa de torpedo, escala = 50 μm . **Figuras 46-47.** Micromorfología de semillas amorfas maduras con el embrión cubierto completamente por el tegmen y parcialmente por la testa (MEB), escala = 1 mm. **Figura 48.** Vista superficial de la testa en una semilla amorfa madura (MEB), escala = 50 μm . **Figura 49.** Vista superficial del tegmen que cubre completamente el embrión en una semilla amorfa madura (MEB), escala = 50 μm . (ED) endospermo, (FU) funículo, (MI) micrópilo, (NU) nucela, (PC) primordio de cotiledón, (TG) tegmen, (TE) testa.



Figuras 50-53. Micromorfología de semillas amorfas maduras (MEB). **59.** Acercamiento del micrópilo, escala = 100 μm . **60.** Acercamiento de la testa en donde se observa el hilo, escala = 100 μm . **52-53.** Embriones amorfos maduros, escala = 500 μm . (CO) cotiledón, (HI) hilo, (HP) hipocótilo, (MI) micrópilo, (TG) tegmen, (TE) testa.

Discusión

Son sumamente escasos los trabajos en donde se analizan poblaciones naturales y se describen con detalle los morfos florales en las cactáceas, por lo que es muy difícil hacer un estudio comparativo que contribuya a entender el origen de las flores unisexuales en la familia.

Opuntia robusta, *Consolea spinosissima* y *Pachycereus pringlei* son las cactáceas con reportes de poblaciones que incluyen individuos hermafroditas, masculinos y femeninos (Fleming *et al.*, 1994; del Castillo y González-Espinosa, 1988; Strittmatter *et al.*, 2002). Sin embargo, a diferencia de *P. pringlei*, las flores masculinas de *O. robusta* son longistilas y las flores femeninas son brevistilas (del Castillo y González-Espinosa, 1988). Del Castillo y González-Espinosa (1988), describen las principales características florales de cada una de las formas sexuales de *O. robusta*, pero debido a que su estudio tiene un enfoque ecológico, no contamos con información sobre el momento en que se detiene el proceso de formación de polen y óvulos para compararlo con el desarrollo de las flores unisexuales de *P. pringlei*. El estudio correspondiente a *C. spinosissima* sí incluye la embriología comparada de los morfos sexuales

En una población dioica de *Opuntia stenopetala*, Orozco (2002) encontró que las flores femeninas en anthesis poseen anteras indehiscentes atrofiadas y las flores masculinas poseen tres tipos florales. En uno de ellos, la cámara del ovario está reducida y los pocos óvulos que contiene se encuentran en la base del ovario. En

el segundo tipo floral, la cavidad del ovario no presenta óvulos y en el tercer tipo, ni siquiera se forma la cavidad del ovario (Orozco, 2002). Las flores femeninas de *C. spinosissima* tienen anteras atrofiadas, las flores masculinas poseen óvulos no viables y las flores “débilmente hermafroditas”, presentan estambres funcionales y ovarios con algunos óvulos viables (Strittmatter *et al.*, 2002). A diferencia de estas dos especies, en todos los morfos florales de *P. pringlei* siempre se observaron estambres, ovario, estilo y estigma bien desarrollados, sólo que en las flores femeninas no hay formación de polen viable, en algunas flores masculinas, el ovario sólo contiene funículos con protuberancias nucelares que no forman tegumentos, y en otras, se encuentran óvulos anormales.

Los óvulos de las flores masculinas en antesis de *O. stenopetala* pueden ser protuberancias amorfas en las que no se desarrollan los tegumentos, o bien, óvulos que detienen su desarrollo cuando apenas son aparentes los primordios de los tegumentos (Orozco, 2002). El proceso degenerativo de los óvulos, tanto de las flores masculinas como de la mayoría de los óvulos de las flores de los individuos “débilmente hermafroditas” de *C. spinosissima*, comienza cuando ya se han formado la ovocélula y las sinérgidas. En *P. pringlei*, las flores de algunos individuos masculinos presentan óvulos con nucela y tegumentos de forma irregular, pero un saco embrionario con ovocélula (gameto femenino) y sinérgidas aparentemente normales.

Las células madres de las microsporas de las flores femeninas de *O. stenopetala* no entran a meiosis (Orozco, 2002) y en *C. spinosissima*, generalmente no

culminan la primera división meiótica, aunque se han observado algunas tétradas de microsporas anormales (Strittmatter *et al.*, 2002). En cambio, a pesar de que no se han encontrado evidencias de la formación de tétradas de microsporas (producto de la meiosis) en las flores femeninas de *P. pringlei* de la población aquí estudiada, fueron observadas tanto células con apariencia de microsporas con una pared de exina (la cual se forma cuando todavía forman parte de la tétrada), como granos de polen jóvenes, aunque con una configuración amorfa.

Las alteraciones del androceo de las flores femeninas de *P. pringlei* corresponden, principalmente, con las células madres de las microsporas y las células del tapete. Las tres capas restantes de la pared de la antera, la epidermis, el endotecio y la capa media, no mostraron diferencias en el desarrollo con respecto a las flores bisexuales.

La primera manifestación anormal observada en las células madres de las microsporas en las flores femeninas de *P. pringlei*, es la forma ondulada de la pared de calosa que las rodea. Esta característica no fue observada en las flores bisexuales de esta especie, ni en ninguna otra del género *Pachycereus* estudiada embriológicamente (Núñez-Mariel *et al.*, 2001; Núñez-Mariel *et al.*, datos no publicados). Los puentes citoplásmicos que atraviesan la pared de calosa entre células madres de las microsporas también se encuentran en las flores bisexuales de *P. pringlei*, pero son menos evidentes. De acuerdo con Shivanna y Johri (1985), estos canales comienzan a ser abundantes al inicio de la meiosis y antes de que ésta concluya, la pared de calosa se hace nuevamente continua.

En las anteras de las flores femeninas de *P. pringlei* en las que se observaron células con apariencia de microsporas recién liberadas de las tétradas, se aprecia además, la hipertrofia de algunas células tapetales que invaden el lóculo de la antera. En anteras estériles del tabaco se observaron células tapetales hipertrofiadas que invaden parcialmente el lóculo pero no pierden su arreglo inicial (Overman y Warmke, 1972). En *Sorghum bicolor* (L.) Moench, las células del tapete aumentan tanto su tamaño, que prácticamente obliteran el lóculo de la antera, o bien, rompen sus paredes y forman un sincicio intratapetal que puede ocupar hasta la mitad del lóculo (Worrall *et al.*, 1992). Según Overman y Warmke (1972), la hipertrofia y la invasión del lóculo de la antera por las células tapetales, puede estar vinculada con la retención de materiales que normalmente son utilizados para la nutrición y el desarrollo de las microsporas.

La estructura de los granos de polen jóvenes de las flores femeninas de *P. pringlei* es anormal. La mayoría de los granos de polen presentan un núcleo, pero no es difícil encontrar algunos binucleados, posiblemente originados por una citocinesis incompleta.

La falta de continuidad en la pared de exina de los granos de polen jóvenes de las flores femeninas de *P. pringlei* puede ser consecuencia de la formación irregular de la pared de calosa que rodea a las células madres de las microsporas. A pesar de que todavía no se sabe con certeza la manera en que actúa la calosa en la conformación de la pared de los granos de polen, se piensa que puede ser un molde para la exina (Chasan, 1992; Worrall *et al.*, 1992). En *Pergularia daemia*

(Forssk.) Chiov. (Asclepiadaceae), la formación de la pared de exina presenta similitudes con las anteras estériles de *P. pringlei* (Vijayaraghavan y Shukla, 1977). Ambas especies presentan un patrón de depósito de exina irregular que incluye zonas con pared de exina continua y glóbulos adheridos (aparentemente de esporopolenina), zonas en las que la pared está formada solamente por estos glóbulos unidos entre sí y zonas que carecen de pared. En la familia Epacridaceae, se ha observado que las partes fragmentadas de la exina coinciden con las zonas de la pared de la tétrada en donde el depósito de calosa es escaso (Ford, 1971 en Vijayaraghavan y Shukla, 1977).

La formación de la pared de exina de los granos de polen depende tanto de las microsporas como del tapete. Cuando las microsporas son liberadas de la tétrada tienen ya una delgada capa de exina que incrementa su grosor por la aportación de esporopolenina proveniente de las células tapetales a través de los cuerpos de Ubisch. Una de las características más notables de las anteras estériles de *P. pringlei* es la presencia masiva de glóbulos adosados a las células tapetales, a los granos de polen o libres en el lóculo de la antera. Estos glóbulos pueden ser derivados de una producción desmedida de esporopolenina y, como resultado, las paredes de los granos de polen presentan una escultura completamente diferente a la de los granos de polen de las flores bisexuales, pues la esporopolenina es depositada en forma irregular. En las anteras de cebada que presentan esterilidad masculina citoplásmica, se ha observado una secreción fuera de control de depósitos de esporopolenina por parte del tapete (Ahokas, 1978 en Shivanna y Johri, 1985). En este caso, los granos de polen finalmente degeneran ya que no

reciben los nutrimentos necesarios debido a que la energía celular del tapete está dirigida a la síntesis de los precursores de la esporopolenina. De manera similar, los granos de polen jóvenes de *P. pringlei* podrían degenerar por una deficiencia en la nutrición provocada por el funcionamiento anormal del tapete. Aunado a esto, la discontinuidad de la exina permite la salida del citoplasma hacia el lóculo de la antera, lo que explica que la mayoría de los granos de polen en las anteras estériles maduras estén vacíos.

Los trabajos sobre el desarrollo anormal de óvulos en flores unisexuales, no son tan abundantes como los referentes al desarrollo de anteras con esterilidad masculina. No obstante, en la actualidad, el estudio de los óvulos ha adquirido un nuevo impulso, debido al auge de las investigaciones sobre la regulación genética del desarrollo de las estructuras reproductoras en plantas. Estos estudios pueden ser de utilidad para comprender el origen de las expresiones fenotípicas que dan lugar a la unisexualidad.

Según Schneitz *et al.* (1998), la morfogénesis de los óvulos muestra un patrón de diferenciación que se caracteriza por el arreglo de tres zonas a lo largo de un eje proximal-distal en los primordios nucelares. La zona proximal de estos primordios determina la formación del funículo, la zona central corresponde con la cálaza y los tegumentos, y finalmente, la zona distal con el desarrollo de la nucela y el saco embrionario. De acuerdo con este modelo, los individuos masculinos de *P. pringlei* con ovarios que solamente contienen funículos con pequeñas protuberancias

nucelares, podrían presentar alguna mutación que esté bloqueando la diferenciación de las regiones centrales y distales en los primordios nucelares.

En *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. se han identificado varios genes que afectan el desarrollo del óvulo (Gasser *et al.*, 1998). Debido a que la principal modificación que se observó en los óvulos de las flores masculinas de *P. pringlei* está relacionada con el desarrollo de los tegumentos y la forma de la nucela, son de particular interés los trabajos sobre las mutaciones que afectan el desarrollo de estas estructuras.

Los óvulos mutantes INO ("inner no outer") de *A. thaliana* presentan similitudes con los óvulos anormales de las flores masculinas de *P. pringlei*, pues pueden formar saco embrionario, el tegumento interno se desarrolla hasta cubrir la nucela y el tegumento externo detiene su crecimiento antes de cubrir completamente al tegumento interno y a la nucela (Baker *et al.*, 1997).

Los mutantes homócigos INO son capaces de producir semillas, aunque con una forma diferente a la que presentan las semillas de las poblaciones naturales de *A. thaliana* (Baker *et al.*, 1997). Los óvulos de estas poblaciones son anfitropos, por lo que las semillas que forman tienen el micrópilo cerca del hilo. Los óvulos INO son ortótropos y, por consiguiente, las semillas que originan tienen el micrópilo y el hilo en posiciones opuestas. Además, la cubierta de las semillas de las poblaciones naturales está integrada por testa y tegmen, en cambio, los embriones de las semillas INO sólo están cubiertos por el tegmen (Baker *et al.*,

1997). La relación entre las semillas de las poblaciones naturales de *A. thaliana* y los homócigos INO, es muy parecida a la observada entre los individuos hermafroditas y algunos individuos masculinos de *P. pringlei* capaces de formar frutos con semillas. Al igual que en los mutantes INO, el micrópilo y el funículo de los óvulos de las flores masculinas de *P. pringlei* se encuentran en posiciones opuestas, o por lo menos lejanas, y las semillas no forman una región hilo-micropilar como en las semillas de los individuos hermafroditas. Así mismo, los embriones maduros de los individuos masculinos de *P. pringlei* están envueltos casi exclusivamente por el tegmen, debido a que la testa sólo forma una pequeña cubierta que incluye al hilo pero no al micrópilo.

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación podemos plantear la siguiente interrogante ¿los individuos de *P. pringlei* con óvulos amorfos pero con sacos embrionarios estructuralmente normales y con semillas maduras amorfas pero que no muestran ninguna característica que parezca impedir su germinación, deben ser catalogados como masculinos? Si partimos del supuesto de que los individuos masculinos sólo forman polen e inhiben la producción de óvulos y semillas “viables”, entonces estamos obligados a reconocer que algunos individuos de *P. pringlei*, catalogados por Fleming *et al.* (1994) como masculinos, en realidad son hermafroditas. Sin embargo, antes de llegar a esta conclusión, es fundamental considerar la eficacia de las semillas de estos individuos en relación a la supervivencia ante los depredadores y al establecimiento de plántulas en un ambiente desértico. En este sentido, las posibilidades de éxito de estas semillas son muy escasas y su contribución a la adecuación del morfo se restringe

exclusivamente a la producción de polen, por lo que estos individuos deben seguir siendo considerados masculinos, al menos hasta que se demuestre que sus semillas son capaces de aportar nuevos individuos a la población.

Tomando en consideración que la mayoría de las cactáceas columnares que se han estudiado son hermafroditas (Fleming, 2002), que el origen ontogenético de los morfos florales de los individuos femeninos y masculinos de *P. pringlei* es bisexual y que de acuerdo Fleming *et al.* (1994) las flores de los individuos neutros de esta especie presentan androceo y gineceo al igual que el resto de los morfos florales, es posible suponer que el ancestro de *P. pringlei* era también hermafrodita. Por consiguiente, para que esta especie presente sistemas reproductivos con individuos unisexuales, fue necesario que se originaran y establecieran mutaciones que provocaran la esterilidad masculina y femenina.

Según Charlesworth (2002), la evolución directa de un sistema hermafrodita a un sistema dioico, requiere que se establezcan simultáneamente dos mutaciones independientes que den lugar tanto a la esterilidad masculina como a la femenina; sin embargo, la probabilidad de que esto suceda es muy baja. Murawski *et al.* (1994) suponen que la mutación que provocó la esterilidad masculina en las poblaciones de *P. pringlei*, se estableció antes que la mutación que condujo a la esterilidad femenina, debido a que los individuos femeninos y hermafroditas tienen una distribución geográfica más amplia que los individuos masculinos.

El modelo clásico sobre evolución de sistemas sexuales en plantas realizado por Charlesworth y Charlesworth (1978), postula que el ginodioicismo y el androdioicismo, es decir, aquellos sistemas en donde coexisten individuos hermafroditas y unisexuales, generalmente no se encuentran en equilibrio y derivan en sistemas dioicos.

Los datos obtenidos por Fleming *et al.* (1994) no sustentan la hipótesis de que las poblaciones ginodioicas y trioicas en esta especie, están en un estado evolutivo de transición hacia un sistema dioico. De acuerdo con Charlesworth y Charlesworth (1978), para que este proceso se lleve a cabo, es necesario que una vez que se han establecido las mutaciones que conducen a la esterilidad masculina y femenina, la adecuación de los individuos unisexuales debe ser dos veces mayor que la adecuación de los hermafroditas. En contraste, Fleming *et al.* (1994) encontraron que en las poblaciones estudiadas de *P. pringlei*, las diferencias entre las adecuaciones de los morfos sexuales eran menores que las requeridas por el modelo de Charlesworth y Charlesworth (1978) y la depresión por endogamia de los hermafroditas era prácticamente inexistente, por lo que las frecuencias de los diferentes fenotipos en estas poblaciones parecen estar en equilibrio y su coexistencia puede explicarse a partir de la relación con el murciélago *Leptonycteris curasoae*, su principal polinizador (Fleming, 2002).

Murawski *et al.* (1994) sostienen que un evento crucial en la evolución de las poblaciones ginodioicas y trioicas en *P. pringlei*, fue la duplicación cromosómica, ya que esta especie es autotetraploide. Este sistema genético propicia niveles

bajos de homocigosidad, lo que pudo haber reducido los efectos de la depresión por endogamia en los individuos hermafroditas. Además, el bajo costo de la autofecundación en este sistema permite el mantenimiento de la autocompatibilidad, que en los individuos hermafroditas de esta especie es de 64% (Murawski *et al.*, 1994).

Fleming *et al.* (1994) proponen como una explicación alternativa para la presencia de morfos unisexuales de *P. pringlei* que la depresión por endogamia de los individuos hermafroditas podía estarse manifestando en la germinación de las semillas y en el crecimiento de las plántulas. Sosa y Fleming (1999) compararon el establecimiento de las plántulas de los individuos hermafroditas y femeninos en esta especie y concluyeron que sus resultados no apoyan la hipótesis planteada por Fleming *et al.* (1994).

De acuerdo con Overman y Warmke (1972), la esterilidad masculina citoplásmica se caracteriza por la formación de anteras con polen abortivo, causando que las flores, inicialmente bisexuales, se conviertan en flores femeninas. Este tipo de esterilidad está determinada por genes presentes en el citoplasma de la ovocélula y en consecuencia sólo se heredan por línea materna (Frank, 1989). Aunque existe evidencia de que estos genes se encuentran principalmente en las mitocondrias, algunos estudios han revelado que pueden ser restaurados por genes nucleares y en consecuencia, se puede recuperar la fertilidad masculina en generaciones posteriores (Frank, 1989). De esta manera, el origen de la esterilidad masculina y su mantenimiento a través del tiempo, es resultado de una

compleja interacción entre genes citoplásmicos y nucleares, así como de la frecuencia y adecuación de los distintos morfos sexuales en las poblaciones naturales.

Las similitudes en algunas características del desarrollo de las anteras de las flores femeninas de *P. pringlei* y las especies que presentan esterilidad citoplásmica masculina, nos permiten suponer que algunas alteraciones que impiden la formación de polen viable en *P. pringlei* podrían ser heredadas a través del genoma citoplásmico. Los resultados obtenidos en la presente investigación identifican la expresión fenotípica de la esterilidad masculina en esta especie, pero es necesario realizar estudios ultraestructurales, genéticos y moleculares con el fin de detectar evidencias de que las alteraciones en el desarrollo de las anteras son consecuencia de mutaciones en el genoma de las mitocondrias o de los plastos.

Además de contribuir a determinar las características embriológicas que conducen a la unisexualidad en *P. pringlei*, el estudio del desarrollo de las estructuras reproductoras en esta especie, servirá como punto de partida para investigaciones posteriores que pretendan reconocer la posible variabilidad fenotípica en cada uno de los morfos, así como estudiar los genes involucrados en el establecimiento del polimorfismo sexual en esta especie

Todavía son escasas los estudios sobre la biología reproductora de la tribu Pachycereeae y solamente se ha demostrado la presencia de sistemas sexuales no hermafroditas en *N. mezcalaensis* (Valiente-Banuet *et al.*, 1997) y *P. pringlei*

(Fleming *et al.* 1994), sin embargo, muchas especies de esta tribu están asociadas a factores que pueden resultar favorables para el establecimiento de individuos unisexuales en poblaciones inicialmente hermafroditas, aun cuando las mutaciones que producen alteraciones en el desarrollo temprano de óvulos y polen, asociadas a la pérdida de su viabilidad, generalmente no son favorecidas puesto que pueden alterar en forma drástica la biología reproductora de la especie, en ciertos casos pueden presentar condiciones que permitan su permanencia. Debido a que la mayoría de las cactáceas columnares mexicanas tienen una relación estrecha con polinizadores eficientes (Valiente-Banuet *et al.*, 2002), las mutaciones que conducen a la esterilidad masculina o femenina presentan la primera condición para que se puedan fijar en sus poblaciones. Por otra parte, de acuerdo con Barret (1998), los ambientes áridos (donde se encuentran muchas especies de esta tribu) pueden promover la evolución de plantas con sexos separados en la medida en que los individuos hermafroditas sean incapaces de mantener las funciones de los órganos sexuales femeninos y masculinos ante la limitación de recursos, o bien, pueden incrementar la depresión por endogamia en los individuos hermafroditas y favorecer la dispersión de las plantas unisexuales.

Literatura citada

- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Baker, S. C., K. Robinson-Beers, J. M. Villanueva, J. C. Gaiser y C. S. Gasser. 1997. Interactions among genes regulating ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 145: 1109-1124.
- Barret, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3: 335-341.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. 2ª ed. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Charlesworth, B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* 112 (988): 975-997.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88: 94-101.
- Chasan, R. 1992. Breaching the callose wall. *Plant Cell* 4: 745-746.

- Del Castillo, R. y M. González-Espinosa. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71: 185-196.
- El-Keblawy, A., J. Lovett-Doust y L. Lovett-Doust. 1996. Gender variation and the evolution of dioecy in *Thymelea hirsuta* (Thymelaeaceae). *Canadian Journal of Botany* 74: 1596-16012.
- Fleming, T. H. 2002. Pollination biology of four species of Sonoran Desert columnar cacti. *En*: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.). *Columnar Cacti and their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson. pp. 207-224.
- Fleming, T. H., S. Maurice, S. L. Buchmann y M. D. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81: 858-867.
- Fleming, T. H., S. Maurice y J. L. Hamrick. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* 12: 279-289.
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *The American Naturalist* 133: 345-376.

- Ganders, F. R. y H. Kennedy. 1978. Gynodioecy in *Mammillaria dioica* (Cactaceae). *Madroño* 25: 234.
- Gasser, C. S., J. Broadhvest y B. A. Hauser. 1998. Genetic analysis of ovule development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 1-24.
- Hoffman, M. T. 1992. Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany* 79: 1382-1388.
- Hunt, D. R. (comp.). 1999. *CITES Cactaceae Checklist*. 2nd ed. Royal Botanic Gardens Kew & International Organization for Succulent Plant Study. Milborne Port.
- Kimnach, M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)* 54: 3-7.
- Leuenberger, B. E. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). *Memoirs of The New York Botanical Garden* 41: 1-141.
- Lindsay, G. y E. Y. Dawson. 1952. Mammillarias of the islands of Northwestern Baja California, Mexico. *Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)* 24: 76-84.

- Lloyd, D. G. y K. S. Bawa. 1984. Modification of the gender of seed plants in varying conditions. *Evolutionary Biology* 17: 255-338.
- Maurice, S., C. Desfeux, A. Mignot y J.-P. Henry. 1998. Is *Silene acaulis* (Caryophyllaceae) a trioecious species? Reproductive biology of two subspecies. *Canadian Journal of Botany* 76: 478-485.
- Murawski, D. A., T. H. Fleming, K. Ritland y J. L. Hamrick. 1994. Mating system of *Pachycereus pringlei*: an autotetraploid cactus. *Heredity* 72: 86-94.
- Núñez-Mariel, C., E. M. Engleman y J. Márquez-Guzmán. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 68: 5-13.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelmann (Cactaceae). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Overman, M. A. y H. E. Warmke. 1972. Cytoplasmic male sterility in sorghum. II. Tapetal behaviour in fertile and sterile anthers. *Journal Heredity* 63: 227-234.
- Parfitt, B. D. 1985. Dioecy in North American Cactaceae: a review. *SIDA* 11: 200-206.

- Schneitz, K., S. Balasubramanian y U. Schiefthaler. 1998. Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. *Trends in Plant Science* 3: 468-472.
- Shivanna, K. R. y B. M. Johri. 1985. The Angiosperm Pollen: Structure and Function. John Wiley & Sons. New Delhi.
- Sosa, V. J. y T. H. Fleming. 1999. Seedling performance in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei*: Effects of maternity and paternity. *Plant Systematic and Evolution* 218: 145-151.
- Strittmatter, L. I., V. Negrón-Ortiz y R. J. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* 89: 1373-1387.
- Valiente-Banuet, A., A. Rojas-Martínez, M. C. Arizmendi y P. Dávila. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *American Journal of Botany* 84: 452-455.
- Valiente-Banuet, A., M. d. C. Arizmendi, A. Rojas-Martínez, A. Casas, H. Godínez-Alvarez, C. Silva y P. Dávila-Aranda. 2002. Biotic interactions and population dynamics of columnar cacti. *En*: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.).

Columnar Cacti and Their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation.
The University of Arizona Press. Tucson. pp. 225-240.

Vijayaraghavan, M. R. y A. K. Shukla. 1977. Absence of callose around the
microspore tetrad and poorly developed exine in *Pergularia daemia*. *Annals of
Botany* 41: 923-026.

Worrall, D., D. L. Hird, R. Hodge, W. Paul, J. Draper y R. Scott. 1992. Premature
dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in
transgenic tobacco. *Plant Cell* 4: 759-771.

CAPÍTULO V

Discusión General

La mayoría de las características embriológicas de *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans* coinciden con las observaciones realizadas en otras especies de cactáceas (Neumann, 1935; Banerji y Sen, 1954; Tiagi, 1954, 1967, 1970; Maheshwari y Chopra, 1955; Chopra, 1957; Engleman, 1960; Kapil y Prakash, 1969; Flores, 2002; Jiménez, 2002; Orozco, 2002; Strittmatter *et al.*, 2002). No obstante, se encontraron procesos y características que no han sido suficientemente documentados en la familia.

Entre las limitaciones más comunes para la caracterización embriológica de la familia Cactaceae se encuentran las descripciones inconsistentes de las estructuras reproductoras y sus procesos de desarrollo, los estudios fragmentarios, la falta de sistematización en la elección de taxa y la carencia de datos en grupos taxonómicos representativos. Estas limitaciones pueden tener como consecuencia la imposibilidad de utilizar caracteres embriológicos como fuente de información taxonómica o el establecimiento de hipótesis filogenéticas erróneas.

En los primeros trabajos embriológicos para la familia Cactaceae fue poco

estudiado el desarrollo de las anteras (Neumann, 1935; Tiagi, 1954, 1967, 1970; Kapil y Prakash, 1969). Además, estas investigaciones se centran en la microsporogénesis y microgametogénesis, sin abordar el desarrollo de la pared de la antera, a pesar de que este proceso puede aportar información taxonómica relevante a nivel suprafamiliar.

Johri *et al.* (1992) mencionan a las cactáceas como un ejemplo de las familias de angiospermas con desarrollo de la pared de la antera de tipo monocotiledóneo, aunque no incluyen este estado de carácter en la diagnosis de la embriología de esta familia, ni citan la referencia de donde obtuvieron esta información. En el capítulo II de esta tesis se hizo la descripción del desarrollo de la pared de la antera en *P. militaris*, siendo ésta la primera publicación (Núñez-Mariel *et al.*, 2001) en la que se documenta detalladamente este proceso para una especie de la tribu Pachycereeae y, posiblemente, para la familia Cactaceae. Posteriormente, se observó este mismo tipo de desarrollo en la pared de la antera en *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002), *Opuntia tomentosa var. tomentosa* (Flores, 2002) y *O. stenopetala* (Orozco, 2002). Los resultados sugieren que este estado de carácter podría ser constante para toda la familia, puesto que se ha encontrado en especies de las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae. Más aún, el desarrollo de la pared de la antera de tipo monocotiledóneo ha sido descrito en otras dicotiledóneas, algunas de ellas, al igual que las cactáceas, pertenecientes al orden Caryophyllales, tales como Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Portulacaceae y Molluginaceae (Davis, 1966), por lo que podría ser una

característica importante para este grupo taxonómico.

El estudio de la megasporogénesis y la megagametogénesis es fundamental para poder catalogar el tipo de desarrollo del saco embrionario. En las cactáceas, ha sido ampliamente referido que el desarrollo del saco embrionario es de tipo *Polygonum* (Banerji y Sen, 1954; Tiagi, 1954, 1967, 1970; Maheshwari y Chopra, 1955; Chopra, 1957; Davis, 1966; Kapil y Prakash, 1969; Hernández-García y García-Villanueva, 1991; Johri *et al.*, 1992; Flores, 2002); sin embargo, tanto la megasporogénesis como la megagametogénesis han sido poco documentadas fotográficamente. En el capítulo III de esta tesis se describió este proceso en *P. gaumeri* y se observó que se pueden formar tanto tríadas como tétradas de megasporas en distintos óvulos de un mismo ovario. En esta especie también se observó la división de la célula micropilar de una díada después de la división de la célula calazal, lo que podría considerarse como un indicio de que la formación de tríadas de megasporas se debe a la supresión de la segunda división meiótica de la célula micropilar de la díada y que el origen del saco embrionario es monospórico. Independientemente de que se formen tríadas o tétradas de megasporas, siempre se observó en *P. gaumeri* que la megaspóra funcional se encontraba en el extremo calazal. Estas características, aunadas a la presencia de una ovocélula, dos células sinérgidas, una célula central binucleada y tres células antípodas, permite establecer que el desarrollo del saco embrionario en *P. gaumeri* es de tipo *Polygonum* y corrobora las observaciones realizadas en *P. militaris* (capítulo I), así como en otras especies de la misma familia (Neumann.

1935; Banerji y Sen, 1954; Tiagi, 1954, 1967, 1970; Maheshwari y Chopra, 1955; Chopra, 1957; Engleman, 1960; Davis, 1966; Kapil y Prakash, 1969; Hernández-García y García-Villanueva, 1991; Johri *et al.*, 1992; Flores, 2002).

Algunas categorías tipológicas, tales como el desarrollo de la pared de la antera "tipo monocotiledóneo" o el desarrollo del megagametofito "tipo Polygonum", se basan en observaciones realizadas inicialmente en ciertas taxa y sirven como modelo para ser comparadas con características o patrones de desarrollo estudiados en otras angiospermas, las cuales frecuentemente no tienen una relación de parentesco cercana. En esta medida, muchas de las clasificaciones de procesos embriológicos carecen de contexto filogenético y por lo tanto presentan limitaciones para la detección de caracteres con importancia taxonómica, así como para el planteamiento de hipótesis sobre el origen y evolución de estos caracteres.

Se han manifestado posiciones contradictorias con respecto al tipo de óvulo en la familia Cactaceae y más que a interpretaciones diferentes de una misma estructura, la controversia resulta de la carencia de definiciones precisas de los distintos tipos de óvulos en las angiospermas. Mirbel (1829, 1830 en Bouman y Boesewinkel, 1991) considera que son campilótropos los óvulos que presentan la cálaza cerca del hilo y del micrópilo como resultado de la curvatura del óvulo. Posteriormente, Maheshwari (1950) define a los óvulos campilótropos simplemente como aquellos que son curvos. Bouman (1984) distingue a los óvulos con nucela recta, como es el caso de los anátropos y ortótropos, de los que

presentan nucela curva, tales como los campilótrofos y anfítropos, aunque reconoce que no existen criterios claros para diferenciar entre estos dos últimos tipos. Bouman y Boesewinkel (1991) consideran que los óvulos campilótrofos se pueden distinguir de los anátropos y ortótrofos por la curvatura del saco embrionario y de la nucela, la cual finalmente propicia la formación de un embrión curvo.

En esta tesis se consideró que el tipo de óvulo de *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *M. geometrizzans* es campilótrofo porque presenta nucela curva y el micrópilo se encuentra cerca del hilo. El término circinótrofo fue descartado para denominar el tipo de óvulo en estas especies debido a que no describe las características de la nucela, ni la posición del micrópilo con respecto al hilo, de tal manera que se retoma el argumento de Flores y Engleman (1976) de que este término debe ser utilizado simplemente para describir al funículo.

En las cinco especies estudiadas se observó que tanto el endospermo como el perispermo en las semillas maduras se encuentran muy reducidos, por lo que fueron catalogadas como no albuminosas y no perispérmicas, en contraposición a la afirmación de Johri *et al.* (1992), quien identifica a las semillas de las cactáceas como albuminosas y perispérmicas.

En ciertas ocasiones, las interpretaciones contradictorias de características y procesos embriológicos en las cactáceas se deben a las propias restricciones

descriptivas de las clasificaciones tipológicas (tipo de óvulo, tipo de semilla, etc.), puesto que las “categorías” o “tipos” que las sustentan no siempre presentan la suficiente diversidad estructural para representar la variación de óvulos y semillas en todos los grupos taxonómicos.

Con el propósito de registrar esta variación en la familia Cactaceae se han realizado algunos esfuerzos para describir la anatomía de óvulos y semillas (Flores, 1976; Flores y Engleman, 1976, Hernández-García y García-Villanueva, 1991), o bien, la micromorfología de las semillas maduras (Leuenberger, 1974; Barthlott y Voit, 1979; Taylor y Clark, 1983; Friedrich y Glaetzle, 1983; Barthlott y Hunt, 2000, Arias, 2002). Sin embargo, ambos tipos de caracteres han sido escasamente estudiados de manera conjunta (Bregman, 1992), aun cuando aportan información complementaria y las características morfológicas pueden ser mejor interpretadas si se conoce su anatomía.

En el capítulo III de esta tesis se analizaron, mediante métodos fenéticos, caracteres anatómicos cualitativos y cuantitativos de óvulos y semillas, así como caracteres micromorfológicos de semillas en 9 especies de la tribu Pachycereeae. Como resultado del análisis de conglomerados se obtuvo un fenograma formado por dos grupos principales, el primero constituido por *Escontria chiotilla*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Polaskia chende* y *Stenocereus dumortieri*, y el segundo por *Pachycereus gaumeri*, *P. militaris*, *P. fulviceps*, *P. pringlei* y *P. marginatus*. Estos resultados coinciden con las propuestas taxonómicas que

agrupan de manera independiente al género *Pachycereus sensu* Barthlott y Hunt (1993) con respecto a *Escontria*, *Myrtillocactus*, *Polaskia* y *Stenocereus* (Gibson y Horak, 1978; Cornejo y Simpson, 1997; Terrazas y Loza-Cornejo, 2002; Arias, 2002).

El fenograma generado en esta tesis muestra que las especies estudiadas de *Pachycereus sensu* Barthlott y Hunt (1993), aunque forman un conglomerado bien definido, presentan valores de distancia mayores que los encontrados entre especies pertenecientes a géneros distintos dentro de la subtribu Stenocereinae. La distancia entre *P. fulviceps* y *P. pringlei* es mayor que la presentada por *P. chende* y *S. dumortieri*; por su parte, *P. militaris* y *P. gaumeri* tienen valores de distancia con *P. pringlei* mayores que los presentados por *M. geometrizzans* y *P. chende* con respecto a *S. dumortieri*. *Pachycereus marginatus* es la especie estudiada de Pachycereinae que más dista de *P. pringlei* y su valor es mayor que la distancia que se encuentra entre *E. chiotilla* y *S. dumortieri*.

Gibson *et al.* (1986) sostienen que las especies de la subtribu Stenocereinae presentan semillas pequeñas, rugosas, opacas, con cutícula estriada y con células de paredes convexas, mientras que la subtribu Pachycereinae contiene las especies que presentan semillas con cutícula lisa y células de paredes ligeramente convexas o planas. Sin embargo, algunos de estos atributos están determinados por varios caracteres que pueden ser analizados independientemente. Las semillas “rugosas” u “opacas” deben su aspecto a

caracteres tales como el tipo de cutícula, el relieve de la pared periclinal externa de la exotesta, los puntos de separación entre tres o más células en esta misma capa y el microrelieve de la pared periclinal externa de la exotesta. El análisis de estos caracteres por separado nos permite describir con mayor precisión las semillas que se encuentran en estados intermedios y que difícilmente pueden ser catalogadas como “rugosas” o “lisas”, o bien, “opacas” o “brillosas”.

El análisis cladístico de *Pachycereus* realizado por Arias (2002) incluye tres caracteres micromorfológicos de las semillas. Según este autor, la forma plana de la pared periclinal de la semilla en la región lateral, la presencia de quilla en la periferia de la testa y el microrelieve liso de la pared periclinal de la semilla son sinapomorfias para la subtribu Pachycereinae.

El análisis de componentes principales generado en esta tesis (capítulo III) identifica un mayor número de caracteres capaces de discriminar entre los grupos formados por las especies estudiadas de las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae *sensu* Gibson y Horak (1978). De acuerdo con este análisis, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. fulviceps* y *P. pringlei* (subtribu Pachycereinae) se distinguen de *E. chiotilla*, *M. geometrizzans*, *P. chende* y *S. dumortieri* (subtribu Stenocereinae) por los siguientes caracteres anatómicos y micromorfológicos: el tipo de borde y la profundidad de la región hilo-micropilar en la semilla, la relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo, el tipo de cutícula en la semilla, la curvatura del embrión maduro, los puntos de separación entre tres o

más células de la exotesta, el relieve de la pared periclinal externa de la exotesta, la distancia relativa del tegumento externo libre ventral en el óvulo, el ancho y el largo de la semilla, la forma de la pared periclinal externa de la exotesta y la curvatura de la nucela en el óvulo. Los once primeros caracteres presentaron cargas con valores absolutos mayores o iguales a 0.8 para el primer componente principal (58% de la variación explicada) y el último carácter presentó la mayor carga (0.78) para el segundo componente principal (13% de la variación explicada).

Pachycereus fulviceps, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* comparten menor largo micropilar, menor largo del tegumento externo libre ventral, mayor curvatura del embrión y mayor largo y ancho de las semillas que las especies de *Stenocereinae* estudiadas; además, el relieve de la pared periclinal de la exotesta plano, la cutícula de la exotesta lisa, el borde de la región hilo-micropilar no expandido, la región hilo-micropilar superficial o ligeramente impresa y la exotesta con hoyos diminutos o no diferenciados.

Algunos caracteres cuantitativos utilizados en este análisis muestran discontinuidades numéricas en la variación que sugieren su utilidad potencial en el reconocimiento de estados de carácter. Con respecto al tamaño de las semillas, *P. fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* presentan valores de 2.7 a 5.2 mm para el largo y de 2.0 a 3.7 mm para el ancho, mientras que *E. chiotilla*, *M. geometrizzans*, *P. chende* y *S. dumortieri* tienen valores de 1.6 a 1.8 mm para el

largo y de 1.1 a 1.3 para el ancho. Así mismo, *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris* y *P. pringlei* tienen valores para la relación entre el largo micropilar y el largo máximo del óvulo que varían de 0.14 a 0.15, para la curvatura del embrión de 182° a 233° y para la distancia relativa del tegumento externo libre ventral de 0.08 a 0.13, a diferencia de *E. chiotilla*, *M. geometrizzans*, *P. chende* y *S. dumortieri*, cuyos valores para estos mismos caracteres son de 0.20 a 0.27, 120° a 172° y 0.15 a 0.18, respectivamente.

Los óvulos y semillas de *P. marginatus* comparten características con el resto de las especies de *Pachycereus* estudiadas y con *E. chiotilla*, *M. geometrizzans*, *P. chende* y *S. dumortieri*. Esto explica la posición intermedia que esta especie presenta en la gráfica de componentes principales, la cual parece reflejar la inestabilidad taxonómica de esta especie, puesto que ha sido colocada tanto en *Pachycereus* (Britton y Rose, 1920; Gibson y Horak, 1978; Barthlott y Hunt, 1993) como en *Stenocereus* (Buxbaum, 1961; Bravo-Hollis, 1978), y de acuerdo a una de las propuestas más recientes, en *Lophocereus* (Arias, 2002).

Para probar la relevancia de los caracteres anatómicos y micromorfológicos de óvulos y semillas en la delimitación genérica de la tribu Pachycereeae, es necesario estudiar un mayor número de especies y evaluar si existen patrones de variación en estos caracteres que permitan reconocer taxa infratribales. Así mismo, es importante analizar si las discontinuidades numéricas observadas en caracteres anatómicos de óvulos y semillas son estadísticamente significativas

para distinguir entre especies o grupos de especies y puedan ser codificadas e incorporadas a futuros análisis cladísticos de la tribu.

En el presente estudio se encontró que la mayoría de los caracteres embriológicos que muestran diferencias entre especies están asociados a las estructuras reproductoras maduras. Probablemente esto se debe a que las variaciones de los procesos de desarrollo de los órganos sexuales pueden tener como consecuencia la formación de anteras y óvulos estériles, lo que a su vez puede conducir al establecimiento de individuos con flores funcionalmente unisexuales y modificar drásticamente la biología reproductora en una especie.

La embriología de cactáceas con sistemas sexuales no hermafroditas es poco conocida (Parfitt, 1985). El sistema sexual trioico de *P. pringlei* es una característica poco común, no solamente entre las cactáceas sino en las angiospermas en general (Parfitt, 1985; Richards, 1986; Ainsworth, 2000).

En el capítulo IV de esta tesis se realizó el estudio embriológico comparativo de los morfos florales de *P. pringlei*. Además de esta especie, se sabe que *Opuntia robusta* presenta poblaciones con individuos hermafroditas, masculinos y femeninos (Del Castillo y González-Espinosa, 1988), aunque a diferencia de *P. pringlei*, no se han reportado individuos neutros y no ha sido estudiada la ontogenia de sus morfos sexuales.

Tomando en consideración que *Neobuxbaumia mezcalaensis* presenta un sistema

sexual androdioico (Valiente-Banuet *et al.*, 1997) y pertenece a la tribu Pachycereeae, al igual que *P. pringlei*, sería de particular interés comparar la ontogenia de las flores masculinas entre ambas especies y determinar si presentan un patrón de desarrollo común. Aunque, esto todavía no es posible debido a que el trabajo que describe su sistema sexual está centrado en el estudio de la polinización y no incluye el desarrollo de los órganos sexuales.

Solamente se han estudiado embriológicamente otras dos especies de cactáceas con sistemas reproductores no hermafroditas, *Consolea spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002) y *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002). Las anteras de las flores femeninas de estas especies detienen su desarrollo en etapas anteriores a las observadas en *P. pringlei*. En cuanto al desarrollo de los óvulos, *P. pringlei* comparte con *O. stenopetala* que en uno de los morfos florales masculinos se forman primordios nucelares que no desarrollan tegumentos y se mantienen en esta etapa hasta la antesis. Otro de los morfos florales masculinos de *P. pringlei* y las flores masculinas de *C. spinosissima* tienen en común la formación de sacos embrionarios; sin embargo, en *C. spinosissima* éstos eventualmente degeneran, mientras que en *P. pringlei* continúan su desarrollo normal hasta la antesis, aunque la nucela y los tegumentos que los rodean tengan una apariencia amorfa.

Las primeras características anormales observadas en las anteras de las flores femeninas de *P. pringlei* son las ondulaciones de la pared de calosa de las células madres de las microsporas. Además, algunos pares de estas células están unidos

por gruesos puentes citoplásmicos en zonas con paredes de calosa sumamente delgadas.

Aunque en los individuos femeninos de la localidad de *P. pringlei* aquí estudiada todavía no se han observado anteras con células madres de las microsporas dividiéndose meióticamente, ni con tétradas de microsporas, es factible que este proceso se lleve a cabo en este morfo, ya que sí fueron observadas células con apariencia de microsporas rodeadas por una pared de exina, la cual es secretada inicialmente por la propia microspora cuando aún forma parte de la tétrada al culminar la meiosis. En estas anteras también se observaron manifestaciones anormales en el desarrollo del tapete, pues algunas células se hipertrofian e invaden el lóculo de la antera, lo que puede estar asociado con la retención de nutrimentos para las microsporas.

Los granos de polen jóvenes de las flores masculinas de *P. pringlei* son amorfos, muchos están hipertrofiados y algunos son binucleados. La pared de los granos de polen en esta etapa tiene una conformación completamente irregular, es discontinua en ciertas zonas y se encuentran adosados numerosos glóbulos, aparentemente de esporopolenina. Estos glóbulos no siguen el patrón de depósito que se observa en la escultura de la exina de los granos de polen jóvenes en las flores perfectas y parecen derivar de una secreción desmedida de esporopolenina por parte del tapete.

La mayoría de los granos de polen en las anteras maduras estériles de *P. pringlei* ya han perdido su protoplasma, sólo eventualmente se pueden observar algunos granos de polen hipertrofiados que todavía lo conservan. El contenido de los lóculos en estas anteras está constituido básicamente por conglomerados de paredes de granos de polen. La ausencia de protoplasma en los granos de polen maduros puede ser explicada por la falta de continuidad en la pared de exina de los granos de polen jóvenes en las flores femeninas, lo que permite su salida hacia el lóculo de la antera, o bien, por la incapacidad del tapete para proveer los nutrimentos necesarios para el desarrollo de los granos de polen jóvenes provocando que finalmente degeneren. Por otra parte, las paredes de los granos de polen en estas anteras frecuentemente están unidas entre sí, presentan zonas sumamente gruesas y estructuras globulares adosadas que forman una escultura completamente diferente a la que se encuentra en las paredes de exina del polen en las flores de los individuos hermafroditas.

Se observaron características de las alteraciones en el desarrollo de la antera de las flores femeninas de *P. pringlei* similares a las observadas en especies con esterilidad citoplásmica masculina. Los resultados obtenidos en la presente investigación identifican las expresiones fenotípicas de la esterilidad masculina en esta especie, pero es necesario realizar estudios ultraestructurales, genéticos y moleculares con el fin de detectar evidencias de que las alteraciones en el desarrollo de las anteras pudieran ser consecuencia de posibles mutaciones en el genoma de las mitocondrias o de los plastos.

De acuerdo con las observaciones realizadas en la presente investigación se identificaron dos morfos florales para los individuos masculinos de *P. pringlei*. Las flores en anthesis observadas más frecuentemente presentan ovarios con funículos que terminan en protuberancias nucelares que no desarrollan tegumentos. En otros individuos masculinos, los ovarios de las flores en anthesis contienen funículos que terminan en un primordio nucelar que no forma tegumentos y algunos funículos que sostienen óvulos anormales. Estos óvulos presentan muy diversas formas, pero generalmente están conformados por una nucela rodeada completamente por el tegumento interno y sólo en la región basal por el tegumento externo.

La presencia de ovarios que contienen solamente funículos con pequeñas protuberancias nucelares apicales en algunos de los individuos de *P. pringlei*, puede deberse a la alteración en el desarrollo de las regiones centrales y distales de los primordios de óvulo, ya que según el modelo de Shneitz *et al.* (1998), la región central determina la formación de la cálaza y los tegumentos mientras que la región distal es responsable de la diferenciación de la nucela y del saco embrionario.

Aunque solamente en uno de los óvulos con un desarrollo anormal de la nucela y los tegumentos se observó un saco embrionario constituido por ovocélula, sinérgidas y una célula central con un núcleo secundario (producto de la fusión de

los núcleos polares), es probable que el resto de los óvulos formados por individuos pertenecientes a este morfo también presenten sacos embrionarios que estructuralmente no muestren ningún impedimento para ser fecundados, ya que estos individuos producen semillas que incluyen embrión y endospermo. En algunos individuos pertenecientes a este morfo se observaron frutos con unas cuantas semillas maduras anormales, pero en otros, los frutos estaban repletos de ellas.

Los estudios sobre la regulación genética del desarrollo de los óvulos en *Arabidopsis thaliana* (Gasser *et al.* 1998; Schneitz, 1999) pueden ser útiles para entender el origen de las expresiones fenotípicas que han conducido a la unisexualidad en otras angiospermas. Los óvulos producidos por el mutante INO ("inner no outer") de *A. thaliana* presentan el fenotipo más parecido a los óvulos de las flores masculinas de *P. pringlei*, pues también forman un saco embrionario normal, el tegumento externo detiene su crecimiento en etapas tempranas de desarrollo y el tegumento interno continúa su desarrollo hasta cubrir la nucela (Baker *et al.* 1997).

De acuerdo con Angenent y Colombo (1996), el hecho de que algunos mutantes de *A. thaliana* y *Petunia hybrida* posean óvulos en los que uno de los tegumentos puede desarrollarse mientras que el otro detiene su crecimiento, como también sucede en algunas flores masculinas de las poblaciones naturales de *P. pringlei*, puede ser indicador de un origen evolutivo independiente para ambos tegumentos.

El embrión de las semillas anormales de *P. pringlei* puede ser recto o presentar diversos grados de curvatura, pero en la mayoría de los casos observados, los cotiledones y el hipocótilo estuvieron relativamente bien diferenciados. En estas semillas, generalmente el embrión se encuentra cubierto en su totalidad por el tegmen pero parcialmente por la testa, además, el hilo y el micrópilo tienen posiciones distantes. Por su parte, los mutantes homócigos INO de *A. thaliana* son capaces de producir semillas viables con una forma distinta a la que presentan las semillas de las poblaciones naturales de esta especie y de manera similar a algunos individuos masculinos de *P. pringlei*, el hilo y el micrópilo se encuentran en posiciones opuestas y el embrión está cubierto sólo por el tegmen (Baker *et al.* 1997).

Baker *et al.* (1997) observaron que las semillas producidas por los mutantes INO de *A. thaliana*, con frecuencia germinaban antes de perder humedad, estando todavía dentro del fruto. Aunque no se hicieron pruebas de germinación en las semillas anormales de *P. pringlei*, es factible que también puedan germinar antes de desecarse, debido a que los embriones están relativamente bien formados y la testa sólo cubre los cotiledones, e incluso, la apariencia de estas semillas en el fruto corresponde al de un fenómeno de viviparidad.

Tomando en consideración que la mayoría de las cactáceas son hermafroditas (Fleming, 2002) y que el origen ontogenético de las flores de los individuos

unisexuales de *P. pringlei* es bisexual, puesto que presentan androceo y gineceo desde las primeras etapas de desarrollo, podemos pensar que el ancestro de esta especie también era hermafrodita.

Según Murawski *et al.* (1994), la mutación que provocó la esterilidad masculina en *P. pringlei*, probablemente se produjo antes que la mutación que provocó la esterilidad femenina, puesto que la distribución geográfica de los individuos femeninos y hermafroditas en esta especie es más amplia que la que presentan los individuos masculinos.

Los resultados obtenidos por Fleming *et al.* (1994, 1998) y Sosa y Fleming (1999) revelaron que las poblaciones trioicas de esta especie se encuentran en equilibrio y por lo tanto no están en un estado evolutivo de transición hacia un sistema dioico como postula el modelo teórico de Charlesworth y Charlesworth (1978) para especies con poblaciones que incluyen individuos hermafroditas y unisexuales.

Fleming *et al.* (1994) explican la coexistencia de individuos hermafroditas, masculinos, femeninos y neutros en algunas de las poblaciones de *P. pringlei* a partir de la condición autotetraploide de esta especie. También a una mayor adecuación de los individuos unisexuales con respecto a los hermafroditas y a la abundancia de su principal polinizador, el murciélago *Leptonycteris curasoe*. Sin embargo, estos autores reconocen que pueden existir otros factores involucrados, por lo que todavía es necesario realizar estudios genéticos.

La caracterización embriológica de los individuos hermafroditas, femeninos y masculinos de *P. pringlei* identifica las etapas de desarrollo en que los órganos femeninos o masculinos pierden su función y define el momento de transición de un estado bisexual a uno unisexual. Esta transición es establecida por las mutaciones en los genes que tienen una función importante en la ontogenia del androceo o del gineceo.

Las alteraciones en el desarrollo de anteras, óvulos y semillas que conducen a la esterilidad masculina o femenina son las expresiones fenotípicas de los genes relacionados con la determinación del sexo. De aquí su importancia para comprender las bases genéticas y moleculares que han dado lugar a la separación de sexos en *P. pringlei*. Su entendimiento contribuirá al establecimiento de hipótesis sobre los mecanismos evolutivos que han dado lugar a un sistema sexual tan complejo como el que presenta esta cactácea columnar.

Literatura citada

- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Angenent, G. C. y L. Colombo. 1996. Molecular control of ovule development. *Trends in plant science* 1(7): 228-232.
- Arias, S. 2002. Filogenia del género *Pachycereus* (Pachycereeae, Cactaceae). Tesis doctoral. Programa de Botánica. Colegio de Postgraduados. Texcoco.
- Baker, S. C., K. Robinson-Beers, J. M. Villanueva, J. C. Gaiser y C. S. Gasser. 1997. Interactions among genes regulating ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 145: 1109-1124.
- Banerji, I. y S. Sen. 1954. A contribution to the cytology and embryology of *Hylocereus undatus* (Haw.) Br. & R. *Bulletin of the Botanical Society of Bengal* 8: 18-23.
- Barthlott, W. y D. R. Hunt. 1993. Cactaceae. *En*: K. Kubitzki, J. G. Rohwer y V. Bittrich (eds.) The families and genera of vascular plants. Vol. II. Springer-Verlag. Berlin. pp. 161-197.

- Barthlott, W. y D. R. Hunt. 2000. Seed-diversity in the Cactaceae: subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research* 5: 173 pp.
- Barthlott, W. y G. Voit. 1979. Mikromorphologie der samenschalen un taxonomie der Cactaceae ein raster-elektronenmikropischer überlick. *Plant Systematic and Evolution* 132: 205-229.
- Bouman, F. 1984. The ovule. *En: B. M. Johri (ed.) Embryology of Angiosperms.* Springer-Verlag. Berlin. pp. 123-157.
- Bouman, F. y F. D. Boesewinkel. 1991. The campylotropous ovules and seeds, their structure and functions. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 113 (2-3).
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bregman, R. 1992. Seed studies in the subtribu Borzicactinae Buxbaum (Cactaceae; morphology, taxonomy, phylogeny and biogeography. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 114 (2): 201-250.
- Britton, N. L. y J. N. Rose. 1920. The Cactaceae. Vol. 2. Carnegie Institution. Washington D. C.

- Buxbaum, F. 1961. Die Entwicklungslinien der tribus Pachycereae - F. Buxb.
Botanische Studien 12: 88-107.
- Cornejo, D. O. y B. B. Simpson. 1997. Analysis of form and function in North
American Columnar Cacti (Tribe Pachycereae). *American Journal of Botany*
84: 1482-1501.
- Charlesworth, B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and
ginodioecy. *The American Naturalist* 112(988): 975-997.
- Chopra, R. N. 1957. The mode of embryo sac development in *Opuntia aurantiaca*
Lindl. - A reinvestigation. *Phytomorphology* 7: 403-406.
- Davis, G. L. 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. John Wiley &
Sons, Inc. New York.
- Del Castillo, R. y M. González-Espinosa. 1988. Una interpretación evolutiva del
polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71: 185-
196.
- Engelman, E. M. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. *American
Journal of Botany* 47: 460-467.

Fleming, T. H. 2002. Pollination biology of four species of Sonoran Desert columnar cacti. *En*: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.). *Columnar Cacti and their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson. pp. 207-224.

Fleming, T. H., S. Maurice, S. L. Buchmann y M. D. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81: 858-867.

Fleming, T. H., S. Maurice y J. L. Hamrick. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* 12: 279-289.

Flores, E. M. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. II Caracteres de valor taxonómico. *Revista de Biología Tropical*. 24(2): 299-321.

Flores, E. M. y E. M. Engleman. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. I Desarrollo y estructura. *Revista de Biología Tropical* 24(2): 199-227.

- Flores, Li. 2002. Estudio embriológico de *Opuntia tomentosa* Salm -Dyck var. *tomentosa* Salm-Dick. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Friedrich, H. y W. Glaetzle. 1983. Seed-morphology as an aid to classifying the genus *Echinopsis* Zucc. *Bradleya* 1: 91-104.
- Gasser, C. S., J. Broadhvest y B. A. Hauser. 1998. Genetic analysis of ovule development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 1-24.
- Gibson, A. C. y K. E. Horak. 1978. Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 999-1057.
- Gibson, A. C., K. C. Spencer, R. Bajaj y J. L. McLaughlin. 1986. The ever-changing landscape of cactus systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 532-555.
- Hernández-García, G. y E. García-Villanueva. 1991. Anatomía comparada de óvulos y semillas de dos especies del género *Mammillaria* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 51: 25-38.

- Jiménez, K. 2002. Embriología de *Pereskia lychnidiflora* (De Candolle 1828). Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Johri, B. M., K. B. Ambegaokar y P. S. Srivastava. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. New York.
- Kapil, R. N. y N. Prakash. 1969. Embryology of *Cereus jamacaru* and *Ferocactus wislizeni* and comments on the systematic position of the Cactaceae. *Botaniska Notiser* 122: 409-426.
- Leuenberger, B. E. 1974. Testa surface characters of Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)* 46(4): 175-180.
- Maheshwari, P. 1950. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill. New York.
- Maheshwari, P. y R. N. Chopra. 1955. The structure and development of the ovule and seed of *Opuntia dillenii* Haw. *Phytomorphology* 5: 112-122.
- Murawski, D. A., T. H. Fleming, K. Ritland y J. L. Hamrick. 1994. Mating system of *Pachycereus pringlei*: an autotetraploid cactus. *Heredity* 72: 86-94.

- Neumann, M. 1935. Die Entwicklung des Pollens, der Samenanlage und des Embryosackes von *Pereskia amapola* var. *argentina*. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 84: 1-30.
- Núñez-Mariel, C., E. M. Engleman y J. Márquez-Guzmán. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 68: 5-13.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelman (Cactaceae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Parfitt, B. D. 1985. Dioecy in North American Cactaceae: a review. *SIDA* 11: 200-206.
- Richards, A. J. 1986. *Plant Breeding Systems*. Unwin Hyman. London.
- Schneitz, K. 1999. The molecular and genetic control of ovule development. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 13-17.
- Schneitz, K., S. Balasubramanian y U. Schiefthaler. 1998. Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. *Trends in Plant Science* 3: 468-472.

- Sosa, V. J. y T. H. Fleming. 1999. Seedling performance in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei*: Effects of maternity and paternity. *Plant Systematic and Evolution* 218: 145-151.
- Strittmatter, L. I., V. Negrón-Ortiz y J. R. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* 89(9): 1373-1387.
- Taylor, N. P. y J. Y. Clark. 1983. Seed-morphology and classification in *Ferocactus* subg. *Ferocactus*. *Bradleya* 1: 3 -16.
- Terrazas, T. y S. Loza-Cornejo. 2002. Phylogenetic relationships of Pachycereeae: a cladistic analysis based on anatomical-morphological data. *En*: T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds.). *Columnar Cacti and their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson. pp. 66-86.
- Tiagi, Y. D. 1954. Studies in the Floral Morphology of *Opuntia Dillenii* Haworth. 1. Development of the ovule and gametophytes. *Botaniska Notiser* 4: 343-356.
- Tiagi, Y. D. 1967. Contribution to the embryology of the genus *Pereskia*. *Proceedings 54th Indian Scientific Congress, Part III: Abstracts*. Hyderabad.

Tiagi, Y. D. 1970. Cactaceae. *En*: B. R. Seshachar (ed.) Proceedings of the Symposium on Comparative Embryology of Angiosperms. *Indian National Science Academy Bulletin* 41: 29-35.

Valiente-Banuet, A., A. Rojas-Martínez, M. C. Arizmendi y P. Dávila. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *American Journal of Botany* 84: 452-455.

CAPÍTULO VI

Conclusiones Generales

Las características del desarrollo de la antera, el óvulo y la semilla son similares entre *Pachycereus gaumeri*, *P. militaris*, *P. fulviceps*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*. Esto sugiere que la mayoría de los caracteres embriológicos son consistentes en la tribu Pachycereeae. Los caracteres que muestran diferencias significativas entre especies, son aquellos que describen la anatomía y la micromorfología de anteras, óvulos y semillas en la madurez.

Los caracteres anatómicos cuantitativos de óvulos y semillas son una fuente potencial de información taxonómica que podría ser incorporada a los estudios filogenéticos de la familia Cactaceae.

El análisis fenético, basado en características anatómicas y micromorfológicas de óvulos y semillas de las especies estudiadas, concuerda con las hipótesis filogenéticas que separan a *Pachycereus* de *Myrtillocactus*, *Escontria*, *Polaskia* y *Stenocereus*.

El estudio embriológico de los morfos sexuales de *P. pringlei* corrobora la existencia de individuos estériles masculinos, estériles femeninos y hermafroditas

en las poblaciones estudiadas de esta especie. Los morfos florales funcionalmente unisexuales tienen apariencia de flores perfectas.

Debido a que la mayoría de las cactáceas columnares son hermafroditas, y a que las flores unisexuales de *P. pringlei* tienen un origen ontogenético bisexual, se sugiere que el ancestro de esta especie era hermafrodita.

La esterilidad masculina está determinada por alteraciones en el desarrollo de las células madres de las microsporas y de las células tapetales.

Las características embriológicas que conducen a la formación de polen estéril en las flores femeninas, tienen similitudes con especies que presentan esterilidad citoplásmica masculina. Sin embargo, se requieren estudios ultraestructurales, genéticos y moleculares para determinar si el genoma citoplásmico está involucrado en las alteraciones del desarrollo de las anteras en *P. pringlei*.

Los individuos masculinos presentan dos tipos florales. En uno de ellos, solamente se desarrolla la región basal del primordio nucelar para dar lugar a funículos que terminan en protuberancias nucleares que nunca llegan a formar tegumentos. En el otro, se producen óvulos con alteraciones en el desarrollo de los tegumentos y la nucela. La formación, tanto del gameto femenino como de embriones en este último tipo floral, indica la presencia de óvulos viables, aunque con un desarrollo anormal.

La embriología comparada de los morfos sexuales en *P. pringlei*, permite reconocer las manifestaciones fenotípicas de los genes involucrados en la diferenciación sexual. Esta información puede ser relevante para entender los mecanismos evolutivos que dan origen a la unisexualidad a partir de un sistema hermafrodita.