



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ESTRUCTURAS
REPRODUCTORAS DE *Mammillaria san-angelensis*
SÁNCHEZ-MEJORADA Y *Mammillaria haageana*
PFEIFFER (CACTACEAE)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

DULCE MARÍA PARADA PONCE



DIRECTOR DE TESIS: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMAN



MÉXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA





GOBIERNO NACIONAL
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Dulce María Parada Ponce

FECHA: 02-Abril-2004

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Estudio comparativo de las estructuras reproductoras de Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada y Mammillaria haageana Pfeiffer (Cactaceae)" realizado por Parada Ponce Dulce María

con número de cuenta 9509670-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Propietario Dra. Sonia Vázquez Santana

Propietario Dra. Ana Laura López Escamilla

Suplente M. en C. María de Lourdes López Curto

M. de Lourdes López C.

Suplente Biol. Laura Patricia Olguín Santos

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEDICATORIA

Dedico esta tesis con enorme agradecimiento a dos personas que han puesto todo su empeño, confianza y amor para ayudarme a superar momentos difíciles. Hoy que logro alcanzar un reto importante en mi vida académica quiero compartirlo con ustedes, pues gracias a todo su apoyo, hoy concluyo esta primera etapa. Estas dos personas son Angel Parada y Gloria Ponce, mis padres.

A mis hermanos, Pablo y León por su apoyo y cariño.

Y, a tres monstruillos que se hacen llamar : Marifer, Emiliano y Emilio (mis sobrinos).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Judith Márquez Guzmán por ser mi asesora, maestra (mamá académica). Su gran entusiasmo y pasión por el estudio de las plantas me motivaron a seguir este camino que apenas comienzo y ya disfruto.

A la Dra. Citlali Núñez agradezco todos sus consejos y la gran disponibilidad que siempre tuvo para ayudarme a resolver mis dudas.

A mis sinodales, Dra. Sonia Vázquez, Dra. Ana Laura López, M. en C. Ma. de Lourdes López y Biól. Laura Patricia Olgún, por sus aportes, comentarios y críticas que enriquecieron esta tesis.

A la Dra. Clara Esquivel Huesca por su tiempo y dedicación para enseñarme las técnicas para procesar el material. Gracias también por sus consejos.

Al Biól. Jerónimo Reyes Santiago y a la Pas. de Biól. Araceli Gutierrez por todo su apoyo y paciencia para la colecta de material.

A la M. en C. Silvia Espinosa Matías por su colaboración en el procesamiento de material y toma de micrografías electrónicas en el MEB. Gracias por tus consejos y sugerencias.

A Ana Isabel Bieler Antolin, Alejandro Martínez Mena y Alfredo Gamboa Romero por su dedicación y apoyo para la toma de fotografías. A José Antonio Hernández Méndez por la disponibilidad y gran apoyo en la toma de fotografías y también por las fotos escaneadas.

A la Biól. Karina Jiménez Durán y al M. en C. Ricardo Wong por su tiempo, sus consejos, su apoyo incondicional y su amistad. Kari, nunca te canses de ayudarnos a todos!!!.

A la Pas. de Biól. Yani Laura Monges Morán por su gran ayuda en la impresión de imágenes.

A PROBETEL por la beca de apoyo económico que me fue otorgada.

A Yani y Andrés, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento en tiempos difíciles, por siempre estar presentes y por todos los momentos compartidos. Gracias por su AMISTAD, los quiero mucho.

A Ela por su apoyo, regaños y enseñanzas, gracias amiga. A Ramón por su amistad.

Al muegano y anexos: Odeth, Minako, Irais, Jaime, Sergio, Alberto, Violeta, Elvia, Ximena, Genghis, Luis, Denise, Erik por las risas compartidas, por su apoyo y cariño.

A mis amigos, compañeros y maestros del lab.: Odeth, Karina, Rich, Ulises, Lluvia, Edith, Goyo, Mónica, Fabiola, Oyuki, Alejandra, Alejandro, Chihuahua, Norma, Jesús, Bibi, Alicia, Lulu, Sonia, Margarita, Margarita Ponce, Guille, Dr. Laguna y especialmente a Mague, por sus consejos, por todo su apoyo y confianza. Mil gracias.

A Rocio por su apoyo, interés, cariño y amistad.

A mis tíos Marta y Carlos por el gran apoyo y cariño que me han dado durante todos estos años.

A mi primo Carlos, por su paciencia, su colaboración, su apoyo incondicional y por ayudarme a tomar fotos. Muchas gracias.

A mi primo Victor, por escuchar, por los consejos, por aguantarme y por los buenos y malos momentos compartidos. Gracias Chino!!!!

A Adrián, por su ayuda en la toma de fotografías, osea, gracias por prestarme tu cámara.

Pausa

De vez en cuando hay que hacer
una pausa
contemplarse a sí mismo
sin la fruición cotidiana
examinar el pasado
rubro por rubro
etapa por etapa
baldosa por baldosa
y no llorarse las mentiras
sino cantarse las verdades

Mario Benedetti

- *La realidad que respiramos puede llevarnos a alturas de vértigo o hacernos caer derrotados; la elección es nuestra.*

Mario Benedetti

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, en el Laboratorio del Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, dentro del taller titulado "Biología del desarrollo y función de las estructuras reproductoras en cactáceas", impartido por los profesores:

- ♣ Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
- ♣ Dra. Margarita Collazo Ortega
- ♣ Dra. Sonia Vázquez Santana
- ♣ Dra. Citlali Yuriria Núñez Mariel
- ♣ M. en C. Silvia Espinosa Matías
- ♣ M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong
- ♣ Biól. Jerónimo Reyes Santiago

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES	
Conservación y comercio de cactáceas.....	5
El cultivo <i>in vitro</i> como estrategia de conservación.....	6
Micropropagación del género <i>Mammillaria</i>	9
Las flores de las cactáceas.....	11
Gineceo.....	13
Desarrollo del óvulo.....	15
Androceo.....	18
Desarrollo de las anteras.....	19
Morfología de la semilla.....	20
El género <i>Mammillaria</i>	22
Distribución geográfica del género <i>Mammillaria</i>	23
Viabilidad de polen en el género <i>Mammillaria</i>	24
Descripción botánica de <i>Mammillaria san-angelensis</i> Sánchez-Mejorada.....	24
Descripción botánica de <i>Mammillaria haageana</i> Pfeiffer.....	25
4. OBJETIVOS.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6. RESULTADOS	
Flor.....	34
Androceo.....	34
Gineceo.....	34
Megasporogénesis y megagametogénesis.....	36
Microsporogénesis y microgametogénesis.....	51
Morfología externa de la semilla.....	59
Viabilidad del polen (Prueba de Alexander).....	65

7. DISCUSIÓN.....	68
8. CONCLUSIONES.....	77
9. LITERATURA CONSULTADA.....	79
10. ANEXO 1.....	84

RESUMEN

Mammillaria san-angelensis es una cactácea en peligro de extinción y endémica del Pedregal de San Ángel. Con el propósito de rescatarla fue propagada *in vitro* en 1985 y reintroducida a su hábitat en 1986. Estas plantas produjeron flores, frutos y semillas fértiles a los 3 años de edad y según el último reporte, continuaron así durante 5 años más (1988-1993). Sin embargo en los últimos 5 años (1998-2003), las plantas produjeron flores pero no así, frutos y semillas.

Considerando que una de las causas relacionadas con la ausencia de frutos y semillas en *M. san-angelensis* podría ser el desarrollo anormal de sus estructuras reproductoras, se decidió estudiar el desarrollo de las mismas. Como punto de referencia se estudiaron las estructuras reproductoras en *Mammillaria haageana*, suponiendo que ésta presenta un desarrollo normal dado que es una planta silvestre y produce frutos y semillas viables; además es una especie taxonómicamente cercana a *M. san-angelensis*.

Los resultados muestran que la morfología externa de las flores de ambas especies es muy semejante. En ambas, el ovario es ínfero y unilocular. El estilo es parcialmente sólido y el estigma es papiloso.

En *M. san-angelensis* el gineceo consta de 3, 4 ó 6 carpelos y en *M. haageana* 2, 3 ó 4. El número de carpelos coincide con el número de lóbulos estigmáticos y cada carpelo presenta un haz vascular.

El óvulo en las dos especies es campilótropo, endóstomo, bitégmico, crasinucelado, funiculado con obturador, presenta protuberancia funicular y su placentación es parietal. Los tegumentos son de origen dermal.

Ambas especies producen una triada de megasporas siendo la funcional la calazal. Suponemos que el saco embrionario es de tipo Polygonum. La ovocélula se observa bien constituida, las sinérgidas presentan aparato filiforme, la célula central es binucleada y las antípodas por ser efímeras no se lograron observar.

Las anteras de *M. san-angelensis* y *M. haageana* son bilobuladas, tetrasporangiadas y presentan drusas en el conectivo. El desarrollo de la pared es de tipo monocotiledóneo. En la formación de las tétradas, la citocinesis es

simultánea. En su mayoría las tétradas son tetraédricas y en ocasiones decusadas. El tapete es binucleado y secretor. En las anteras maduras sólo persisten la epidermis y el endotecio. La dehiscencia de las anteras es longitudinal y ocurre antes de la antesis.

Los granos de polen se liberan tricelulares y son tri, tetra y pericarpados, perforados, microequinados y globosos. Sin embargo el polen de *M. san-angelensis* es de mayor tamaño que el de *M. haageana*. En ambas especies el porcentaje de viabilidad de polen fue de 91%.

Las semillas en las dos especies estudiadas son ovoides y presentan un relieve cóncavo. En *M. san-angelensis* las células de la cubierta seminal son más o menos isodiamétricas mientras que en *M. haageana* son elongadas y presentan ondulaciones en forma de U.

De acuerdo con estos resultados, la causa de que no se formen frutos y semillas en *M. san-angelensis* (propagada *in vitro*), no se relaciona con el desarrollo de sus estructuras reproductoras, ya que éstas se desarrollan normalmente.

INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son plantas suculentas y perennes pertenecientes a las angiospermas, a la clase de las Dicotiledóneas y al orden Caryophyllales. Esta familia es endémica del continente Americano y se encuentra ampliamente distribuida desde Canadá hasta la Patagonia en Argentina (Arias, 1997). Sin embargo existen especies de *Opuntia* y *Rhipsalis* que han sido introducidas en otros continentes (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978). En México se encuentra uno de los centros de diversidad más importantes de la familia, siendo sus zonas áridas y semiáridas donde habitan la mayor parte de las especies (Arias, 1993; Hernández y Godínez, 1994). Cabe mencionar que este tipo de zonas cubren cerca del 50% de la superficie del país (Toledo y Ordóñez, 1993).

De acuerdo con la clasificación realizada por el Grupo Internacional de Sistemática en Cactáceas, se reconocen 4 subfamilias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Anderson, 2001).

La subfamilia Cactoideae comprende plantas arbóreas, arbustivas, cespitosas, trepadoras o epífitas. Sus tallos presentan formas desde globosas hasta columnares, además pueden presentar costillas o tubérculos. Esta subfamilia presenta la mayor riqueza en formas de vida y número de géneros, por lo que se divide a su vez en 9 tribus: Calymmanthae, Hilocereae, Cereae, Trichocereae, Notocactae, Rhipsalideae, Browningieae, Pachycereae y Cactae (Anderson, 2001).

Dentro de la tribu Cactae, se encuentra el género *Mammillaria*, el cual es considerado casi endémico de México. Este género alberga muchas especies que son valoradas por coleccionistas debido a que son plantas con formas muy llamativas y flores de colores muy diversos (Sánchez-Mejorada, 1982). Así mismo se ha reportado que algunas especies (*M. craigii*, *M. grahammi* y *M. senilis*) contienen metabolitos secundarios (alucinógenos), por lo que se podrían utilizar en la industria farmacéutica (Evans y Hofmann, 1979).

Dada la importancia que estos recursos florísticos tienen para México, es primordial poner en marcha proyectos de manejo y conservación de los mismos. Pero para poder realizarlos con éxito, es necesario tener un acervo informativo de las especies que incluya datos genéticos, reproductivos y fitogeográficos, entre otros (Hernández y Godínez, 1994).

Mammillaria san-angelensis, especie endémica del Pedregal de San Ángel, fue reportada como extinta por la UICN en 1984, razón por la cual en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del JB-IB-UNAM, se comenzó un proyecto de propagación masiva *in vitro* de esta especie con el propósito de rescatarla. La propagación masiva tuvo éxito y las plantas pudieron ser introducidas su hábitat natural. Después de dos años se observó que estas plantas produjeron flores, frutos y semillas viables (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989). Sin embargo hoy en día estas mismas plantas a pesar de que florecen, ya no producen frutos ni semillas (Biól. Jerónimo Reyes y Araceli Gutiérrez, com. pers.).

El presente trabajo aporta datos acerca del desarrollo de las estructuras reproductoras de esta especie, con la finalidad de determinar si es que existe alguna alteración en las mismas que pudiera estar afectando su reproducción sexual y por ende el intento de rescatar la especie. Dichas alteraciones pueden ser consecuencia del proceso de propagación *in vitro* al cual han estado sometidas durante casi 20 años. Las alteraciones que pueden presentar las plantas cultivadas *in vitro* a partir de tejidos o células somáticas se conocen de manera general como variaciones somaclonales.

Para poder tener un marco de referencia en cuanto a las características del desarrollo normal de las estructuras reproductoras, se trabajó también con *Mammillaria haageana*, especie silvestre y cercanamente relacionada con *M. san angelensis*.

ANTECEDENTES

Conservación y comercio de cactáceas

La diversidad florística de la familia Cactaceae en México es muy notable, al igual que el grado de endemismos que presenta (de 850 especies, 717 son endémicas y de 52 géneros, 18 son endémicos) (Arias, 1993). Desafortunadamente, algunos autores afirman que es una de las familias de angiospermas más amenazadas (Bravo-Hollis, 1978; Sánchez-Mejorada, 1982; Arias, 1993; Hernández y Godínez, 1994).

Las principales causas de la disminución de las poblaciones de cactáceas son la destrucción o modificación de su hábitat y su sobrecolecta (Sánchez-Mejorada, 1982; Arias, 1993; Hernández y Godínez 1994). La destrucción del hábitat ocurre por los desmontes con fines agrícolas, el sobrepastoreo, apertura de vías de comunicación y ductos, erosión del suelo e inundación de zonas por embalses (Arias, 1993).

Además, después de un episodio de perturbación, el establecimiento de las poblaciones de cactáceas es extremadamente lento, debido a que tienen tasas de crecimiento muy bajas y sus ciclos de vida son frecuentemente muy largos (Gibson y Nobel, 1986; Hernández y Godínez, 1994).

En México el aprovechamiento de las cactáceas es variado, se utilizan como medicina, alimento, forraje o material de construcción, pero su uso como plantas de ornato debido a sus extrañas formas y hermosas flores, es una de las principales razones por las que los aficionados de todo el mundo las coleccionan (Bravo-Hollis, 1997).

Así, el comercio de cactáceas en México alcanza cifras muy altas. Por desgracia los comerciantes de cactáceas no tienen interés alguno en la conservación de tan valiosas plantas ya que, en general, la cuantiosa demanda nacional e internacional se satisface con ejemplares colectados en el campo, sin darse cuenta de los beneficios potenciales de su comercio racional a partir de ejemplares cultivados en viveros (Sánchez-Mejorada, 1982).

Desafortunadamente esto se refleja en el alto número de especies con algún grado de amenaza que se incluyen en listas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN) y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (por sus siglas en inglés, CITES). Sin embargo, a pesar de las restricciones que se establecen en función de estas listas, el tráfico ilegal de especies sigue siendo muy alto (Arias, 1993).

Se ha afirmado que el éxito de la conservación de la diversidad depende en gran medida del conocimiento de las especies que se quieren conservar. En este sentido, el reto al que nos enfrentamos es la generación y organización de un acervo informativo básico que incluya aspectos genéticos, ecológicos, reproductivos y fitogeográficos de las especies (Hernández y Godínez, 1994).

El cultivo *in vitro* como estrategia de conservación

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ("en vidrio"), se define como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo aséptico de protoplastos, células, tejidos y órganos empleando medios nutritivos artificiales y condiciones ambientales controladas (luz, temperatura, fotoperiodo) (Pérez, 1998).

George (1993), define a la micropropagación como la reproducción asexual *in vitro* a partir de pequeños fragmentos de tejido llamados "explantes", induciendo la formación de plantas vía organogénesis y/o embriogénesis somática.

Entre las principales aplicaciones del cultivo *in vitro* se encuentran la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* y la ingeniería genética (Pérez, 1998).

El rescate de especies en peligro de extinción por medio del cultivo *in vitro* resulta una buena alternativa, ya que permite al investigador manipular el sistema experimental en varias rutas para resolver el problema. Además si se

generan grandes cantidades de plantas, éstas podrían ser introducidas a su hábitat (Rubluo, 1997).

El cultivo *in vitro* puede tener más ventajas que otros medios de propagación convencionales dado que se puede lograr una rápida propagación bajo condiciones controladas y libres de patógenos, así como la producción de un gran número de plántulas a partir de cantidades muy pequeñas del material inicial, en algunos casos tan pequeñas como una yema ó semilla (Fay, 1994).

Cuando el objetivo, es rescatar especies en peligro de extinción por medio de técnicas *in vitro*, se intenta maximizar la diversidad genética de las plantas. Es por ello que el material ideal para iniciar los cultivos son las semillas. Sin embargo, en algunos casos cuando las semillas no están disponibles, los cultivos se comienzan de los explantes que tengan actividad meristemática por ejemplo yemas apicales o laterales. En este sentido, se espera que la integridad genética de las plantas se retenga, sin riesgos de inducir variación somaclonal relacionada con el uso de callos y sistemas de cultivos en suspensión (Dodds, 1991 citado en Fay, 1994). No obstante para las plantas que se encuentran en un crítico cuello de botella genético, la variación somaclonal puede ser una herramienta útil en el futuro (Bramwell, 1990; Jacobsen y Dohmen, 1990 citados en Fay, 1994).

En las especies en peligro recuperadas, es importante conservar la variabilidad genética de las poblaciones tanto como sea posible para favorecer la supervivencia de la especie hoy y en el futuro, ya que ésto proporcionará la plasticidad necesaria para su conveniencia y éxito (Rubluo *et al.*, 1993).

La propagación artificial de especies raras y en peligro de extinción, es considerada una buena solución para reducir la amenaza de las poblaciones silvestres. Pero, los altos costos de producción y el tiempo que requieren las plantas para completar su ciclo de vida, se consideran los obstáculos más comunes para su propagación exitosa. Por el contrario, la propagación masiva *in vitro* reduce los costos y se puede conseguir completar el ciclo de vida dentro de un tiempo razonable, reduciendo el riesgo de las poblaciones silvestres que se encuentran el peligro (Rubluo *et al.*, 1993).

Desafortunadamente parece ser que la mayoría de los proyectos de propagación *in vitro* para el rescate de especies amenazadas que se han realizado, aportan únicamente los protocolos para su propagación masiva, pero esto sólo cumple con la primera fase del rescate.

La introducción de plantas propagadas *in vitro* a sus áreas de distribución originales se ha considerado una tarea difícil. Un requerimiento que es necesario considerar antes de intentar hacer una restauración masiva, es que durante cierto tiempo debe de realizarse un monitoreo del comportamiento y rendimiento de la población restaurada (el tiempo necesario para determinar la viabilidad y éxito reproductivo de la descendencia). Las poblaciones reestablecidas deben ser capaces de reproducirse en su ambiente natural, garantizando así el cumplimiento de su ciclo de vida, esto aseguraría la permanencia por sí mismas en condiciones silvestres (Rubluo *et al.*, 1993).

Comúnmente se hacen estudios citológicos sobre los cultivos *in vitro*, pero son pocas las investigaciones que relacionan el material de partida (explante) y el resultado final (las plantas) (Pérez, 1998). Sin embargo, se ha comprobado que ocurren modificaciones genéticas en las células y tejidos cultivados *in vitro*, este fenómeno se conoce como variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981). Algunas de las especies donde ésta se ha reportado son *Avena sativa*, *Triticum aestivum* (Cummings *et al.*, 1976; Parking *et al.*, 1980 citados en Yaeoman, 1986), *Musa paradisi*, *Solanum tuberosum* (Smith y Drew, 1990; Shepard *et al.*, 1980 citados en Skirvin *et al.*, 1994) y *Vitis vinifera* (Kuksova *et al.*, 1997). La variación somaclonal se refiere a la variación genética o epigenética presente en las plantas o tejidos que proceden del tejido somático. Cuando se emplean células sexuales la variabilidad que se produce se denomina gametoclinal. En general la variación somaclonal se origina de las mutaciones preexistentes en los tejidos que se emplearon para los cultivos *in vitro* y de las mutaciones ocurridas durante el cultivo *in vitro* (Skirvin *et al.*, 1994; Pérez, 1998).

Entre las variaciones que se producen en el cultivo *in vitro* tenemos a las mutaciones, los cambios epigenéticos (cambios en el fenotipo no heredables) y el efecto del rejuvenecimiento. Adicionalmente deben considerarse las

variaciones provocadas por el ambiente, las cuales influyen en caracteres cuantitativos como el rendimiento (Pérez, 1998).

Pérez (1998) concluye diciendo que las grandes ventajas del cultivo *in vitro* para la mejora genética no están dadas en la variabilidad que ésta produce, sino en las facilidades que brinda para aplicar los tratamientos mutagénicos y para la selección. Los agentes mutagénicos, pueden ser sustancias químicas (como la colchicina) o radiaciones ionizantes (rayos alfa, beta y gama).

Micropropagación del género *Mammillaria*

Las mamilarias son plantas que presentan una gran variedad de formas y sus flores se caracterizan por tener colores muy llamativos. Las especies que conforman este género han sido objeto de una gran depredación ya que la demanda comercial es muy alta y los métodos convencionales de propagación son insuficientes para cubrirla (Bravo-Hollis, 1978; Sánchez-Mejorada, 1982).

Algunas de las mamilarias que han sido propagadas por cultivo de tejidos *in vitro* son: *M. woodsii*, *M. prolifera*, *M. carmenae*, *M. duwei*, *M. wrightii*, *M. albinata*, *M. gracilis*, *M. lasiacantha*, *M. mammilaris*, *M. nana*, *M. parkinsonii*, *M. solisioides*, *M. theresae* y *M. viperina* (Minocha y Mehra, 1974; Vyskot y Jára, 1984; Delgadillo-Reynoso, 1990; Clayton *et al.*, 1990; Fay y Gratton, 1992 citados en Briones, 2002).

Sánchez-Mejorada (1981) propone el nombre de *Mammillaria san-angelensis* para las biznagas de espinas blancas que se distribuyen en el Pedregal de San Ángel, región que se ubica en la zona sur del Valle de México. Así mismo, les da la categoría de endémicas de dicha región. Posteriormente en 1985 se publica en la IUCN que *Mammillaria san-angelensis* se encuentra en peligro de extinción debido a la sobrecolecta y al crecimiento de la ciudad de México. Es entonces cuando investigadores del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM deciden intentar su rescate implementando la propagación masiva *in vitro*. En esa investigación se plantearon dos objetivos: a) estudiar las respuestas morfogénicas de los

explantes cultivados *in vitro* de plántulas de *M. san-angelensis* inducidas por reguladores de crecimiento, y b) intentar una propagación masiva *in vitro* como base de un programa de rescate efectivo (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989).

La población silvestre total de *M. san-angelensis* la conformaban 5 plantas, a partir de las cuales se obtuvieron 15 semillas. Debido a la escasez de semillas de esta especie, se realizaron experimentos preliminares con una especie filogenéticamente cercana, *Mammillaria haageana*, de la cual había suficiente material disponible (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989).

Después de varios ensayos, se escogieron las condiciones que dieron la mejor producción de plantas de *M. haageana* para experimentar con *M. san-angelensis* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989).

De las 15 semillas de *M. san-angelensis* que se pusieron a germinar, sólo 8 lo hicieron y llegaron a ser plántulas, cabe mencionar que la germinación tardó mucho tiempo. Después de 6 meses las plántulas alcanzaron una altura de 5-7 mm, entonces estaban listas para utilizarse como fuente de explantes. Los explantes fueron segmentos apicales y laterales de las plántulas (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Rubluo *et al.*, 1993).

Se logró propagar *in vitro* vía organogénesis indirecta a *Mammillaria san-angelensis*; se generaron de 3 a 5 brotes enraizados por cada cm³ de callo cada 2 meses, lo cual permitió en mayo de 1986 introducir 47 plántulas a su hábitat (área de exhibición del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM ubicado en el Pedregal de San Ángel). En noviembre de 1988, florecieron 4 individuos, al igual que lo hacía la única planta silvestre que se conservaba para ese entonces. En abril y mayo de 1989 se colectaron los frutos y el 100% de las semillas obtenidas de éstos, germinaron *in vitro* (Chávez y Rubluo, 1995).

También reportan que en 1993, cientos de plantas producto del cultivo *in vitro*, tanto en el campo como en el invernadero florecieron y produjeron semillas fértiles (Rubluo *et al.*, 1993). Otra observación que se hizo al año de su introducción, es que 3 individuos desarrollaron brotes adicionales, mostrando una continua adaptación al ambiente (Rubluo *et al.*, 1993).

Con esto, el ciclo de vida completo de una especie propagada *in vitro* casi extinta y reintroducida en el campo, fue consumado exitosamente (Rubluo *et al.*, 1993).

Palomino y colaboradores en 1999, determinaron las características citogenéticas de las plantas de *M. san-angelensis* obtenidas por cultivo *in vitro*, analizando su contenido de DNA nuclear, el nivel de ploidía y el grado de endopoliploidía. Las plantas utilizadas en este estudio estuvieron más de 7 años en medio MS con auxinas y los controles fueron plantas regeneradas *in vitro* sin auxinas. Este trabajo se sustentó en el hecho de que el cultivo *in vitro* prolongado y la presencia de reguladores de crecimiento exógenos son factores que pueden inducir inestabilidad genética. Los resultados de dicha investigación mostraron claramente que a pesar del cultivo a largo plazo y la presencia de auxinas en el medio nutritivo, los individuos propagados *in vitro* de *M. san-angelensis* no mostraron cambios cariológicos significativos. Presentaron una aparente estabilidad en el tamaño del genoma, en la ploidía y el patrón de endopoliploidización.

Las flores de las cactáceas

De forma general la flor en las angiospermas consta de un conjunto de hojas especializadas que desempeñan una función específica en la reproducción sexual. Si enumeramos el nombre de cada verticilo de hojas especializadas de una flor completa, comenzando de la parte externa hacia el interior, ésta se compone de **cáliz** (formado de sépalos), **corola** (formado de pétalos), **androceo** (formado de estambres) donde se producen los granos de polen y por consecuencia los gametos masculinos y **gineceo** (formado por el ovario, el estilo y el estigma), dentro del ovario se localizan uno o más óvulos que contienen al gametofito femenino (Anderson, 2001).

El desarrollo de la flor de las cactáceas inicia por la diferenciación meristemática de una yema axial. La zona meristemática más externa originará

los órganos florales (cáliz y corola), la zona media originará los estambres y finalmente la central los carpelos (Bravo-Hollis, 1978).

Las flores de las cactáceas surgen de las aréolas, comúnmente una sola flor por cada aréola, pero en el caso de *Myrtillocactus geometrizans* pueden surgir varias flores de una misma aréola. El género *Pereskia* es el único que presenta una inflorescencia verdadera. Generalmente las flores surgen de las aréolas ubicadas en el ápice de los tubérculos, pero algunas especies presentan aréolas dimórficas, es decir, una parte origina espinas y la otra flores (Bravo-Hollis, 1978). A este respecto Boke en 1953, reportó que en el género *Mammillaria* las aréolas productoras de espinas se localizan en la punta del podario y las florales se localizan en la base del mismo.

El tamaño de las flores de las cactáceas varía, llegan a medir desde 6 mm como en *Rhipsalis* y *Pseudorhipsalis* hasta 40 cm como en *Hylocereus* y *Selenicereus*. La mayoría de las flores poseen simetría radiada aunque hay casos de zigomorfia en *Epiphyllum*, *Rathbunia* y *Heliocereus* (Bravo-Hollis, 1978).

Las flores diurnas presentan generalmente colores amarillos o varios tonos de rojo y las flores nocturnas son habitualmente blancas. En algunas especies de *Disocactus* las flores presentan matices azules. La forma de las flores comúnmente es campanulada o infundibuliforme y pocas veces urceolada y tubular (Barthlott y Hunt, 1993).

Dentro de la familia Cactaceae, las modificaciones evolutivas en la flor han afectado el tamaño, número y la estructura de sus órganos hasta llegar a suprimir algunos. En el caso de géneros como *Mammillaria* y *Rhipsalis* las flores se han simplificado (Bravo-Hollis, 1978).

Las flores de las cactáceas están en parte inmersas en tejido del tallo, al cual se le denomina pericarpelo, en ocasiones se refieren a éste como tubo floral. Es como si la parte basal de la flor se hubiera sumido en el tejido receptacular. Generalmente la parte externa del pericarpelo está cubierta por escamas u hojas rudimentarias llamadas segmentos del perianto, las cuales presentan aréolas. Géneros como *Ariocarpus* y *Mammillaria* tienen flores desnudas sin escamas o estructuras externas (Anderson, 2001).

En *Mammillaria* la fusión de los segmentos del perianto se da en su base, de manera que forman un tubo periantal corto, independiente del receptacular, sin embargo son tan semejantes que parecen una misma estructura (Bravo-Hollis, 1978).

El néctar es la substancia que se da como recompensa para el polinizador, se produce generalmente en la parte basal del tubo floral es decir en la base de los estambres (Anderson, 2001). En *Mammillaria san-angelensis*, el nectario se localiza en la base de los filamentos de las anteras, los cuales se fusionan para formar la cámara nectarífera (Montero, 2004).

Finalmente para recapitular podemos decir que el conjunto de caracteres que hacen únicas a las flores de las cactáceas son: numerosos segmentos del perianto diferenciados como sépalos y pétalos; numerosos estambres; un pistilo de cuatro o más carpelos fusionados dentro de una copa floral y un ovario unilocular con placentación parietal. Además las cactáceas son de las pocas plantas en las que la parte externa del ovario ínfero es receptacular (Boke, 1980).

Gineceo

El gineceo es el conjunto de hojas fértiles llamadas carpelos que al unirse integran el ovario, el estilo y el estigma. En las cactáceas el gineceo o pistilo usualmente consiste de varios carpelos (Buxbaum, 1953).

Ross (1982) reporta que en *Pereskia corrugata*, *Opuntia engelmanni*, *Epiphyllum strictus*, *Echinocereus reichenbachii* var. *albispinus* y *Mammillaria compressa* durante las primeras etapas de desarrollo, el surgimiento de los carpelos es simultáneo al de los estambres.

En *Pereskia* cinco o más primordios carpelares se originan separados en el ápice floral convexo y posiblemente se fusionan para formar un gineceo sincárpico. En todos los demás géneros el ovario unilocular está formado por cuatro o más de veinte carpelos (Barthlott y Hunt, 1993).

Los carpelos se originan en el meristemo central del receptáculo que en la mayoría de las cactáceas se hunde formando un hipanto (comúnmente llamado copa floral o tubo floral). En esta cavidad queda alojado el ovario, órgano que produce los óvulos, es decir, los primordios de la semilla. La región del hipanto que rodea al ovario constituye el pericarpelo o perianto. Fue así como la inserción del ovario en el perianto originó el ovario ínfero de las cactáceas, sin embargo, para la subfamilia Pereskioideae se ha reportado el ovario súpero-semi-ínfero (Boke, 1963; Bravo-Hollis 1978).

Las partes laminares de los carpelos están unidas para formar un estilo tubular, el cual se alarga en la punta y es ahí donde los carpelos se separan y forman los lóbulos del estigma. Cada carpelo tiene únicamente un haz vascular el cual llega casi hasta la punta del lóbulo estigmático. Así el número de haces vasculares es igual al número de lóbulos del estigma. La forma de corona persiste en los estigmas maduros si se da un crecimiento uniforme de todas las partes como en *Malacocarpus fricii* (Barthlott y Hunt, 1993).

Prácticamente en todos los géneros es posible distinguir el estilo del estigma debido a las papilas que presentan los lóbulos estigmáticos. Pueden presentarse varios tipos de estigmas: en *Dolichothele* las papilas crecen hasta la punta de los lóbulos pero en *Malacocarpus* la pequeña punta de cada lóbulo carece de papilas; otro tipo se observa en *Gymnocaliciun sutterianum*, en donde las papilas son tan cortas que forman una cubierta tipo terciopelo en la cara interna de los lóbulos, únicamente cerca de la punta de cada lóbulo se forman algunos tricomas. Un tercer tipo se observa cuando la epidermis papilosa cubre toda la superficie de los lóbulos (*Selenicereus macdonaldiae*); cabe mencionar que la epidermis papilosa continúa hasta debajo de los lóbulos dentro del tubo estilar. También se han observado lóbulos divididos como en *Hilocereus lemairei*. En *Rhipsalis* el lóbulo del estigma está completamente cubierto por largas papilas excepto en una franja en la parte externa del lóbulo. También se pueden formar estigmas cerrados como resultado de un crecimiento incompleto y pueden presentarse con margen prominente o sin él. *Zygocactus* presenta este tipo de estigmas, pero en este caso el estigma

permanece cerrado debido a que las papilas del estigma son muy largas y como resultado los lóbulos no se pueden separar (Buxbaum, 1953).

Los óvulos surgen de la placenta, tejido que se desarrolla generalmente en los bordes de las hojas carpelares. En las cactáceas pueden distinguirse dos tipos de placentación (con formas intermedias): la basal-laminar, con placentación en los septos que conectan con el eje floral como en *Pereskia*; y la hipantal, donde la placenta se forma en la pared del ovario ínfero (Leins y Schwitalla, 1988 citados por Barthlott y Hunt, 1993).

En la familia Cactaceae se presentan diferentes tipos de óvulo, estos pueden ser anátropos, hemianátropos, campilótropos y circinótropos (Johri *et al.*, 1992). Tiagi (1970) reporta que en *Pereskia* y *Zigocactus* el óvulo es anátropo cuando joven y campilótropo en la madurez; circinótropo en *Pereskiopsis*, *Opuntia*, *Nopalea* e *Hilocereus* y hemircinótropo en *Mammillaria* y *Rhipsalis*. En el caso de *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Mammillaria rhodantha*, *Mammillaria compressa* (Hernández y García, 1991), *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002), *Pereskia nemosa* (Leuenberger, 1986) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002) el óvulo es campilótropo.

También se ha reportado que el óvulo es bitégmico, crasinucelado y endóstomo como en *Astrophytum myriostigma*, *Thelocactus bicolor*, *Toumeyia papyracantha* (Engleman, 1960), *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Mammillaria rhodantha*, *Mammillaria compressa* (Hernández y García, 1991), *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002).

Desarrollo del óvulo

Los primordios de óvulo son protuberancias de tejido homogéneo rodeado por una protodermis que surgen de la placenta (pared interna del ovario) (Bhojwani y Bhatnagar, 2000). El tegumento interno surge como un anillo completo alrededor del primordio ovular a diferencia del externo que es un tanto asimétrico. El micrópilo está formado por la pluriestratificación del

tegumento interno en esta zona, dando al óvulo la denominación de endóstomo.

Frecuentemente en la región calazal del óvulo se presenta un espacio entre los tegumentos (Davis, 1966; Tiagi, 1970; Corner, 1976; Johri *et al.*, 1992). Dicho espacio se ha reportado en óvulos de *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Thelocactus bicolor* (Engleman, 1960) y *Pereskia lychnidiflora* donde también se hace evidente un espacio entre la nucela y el tegumento interno en la región cercana a la cálaza (Jiménez, 2002). Cabe mencionar que en *Toumeyia papyracantha* el espacio integumentario está limitado por una gran cantidad de calosa (Engleman, 1960).

Las células arquesporales se forman a partir de células en posición hipodérmica las cuales son de mayor tamaño con núcleos muy evidentes. A su vez cada célula arquesporial se divide periclinalmente dando lugar a una célula parietal en posición hipodérmica y a una célula madre de las megasporas en la parte más interna (Johri *et al.*, 1992). Aunque el arquesporio femenino usualmente está formado por más de una célula, solo una célula madre de la megaspora se desarrollará para formar el saco embrionario (Tiagi, 1970). Tal es el caso de *Astrophytum myriostigma* que presenta un arquesporio de 1 a 5 células (Engleman, 1960).

La célula madre de las megasporas se divide meióticamente y da origen a una tétrada de megasporas ya sea lineal o con forma de T, a veces también se presentan triadas (Tiagi, 1970; Johri *et al.*, 1992).

En *Astrophytum myriostigma*, *Thelocactus bicolor*, *Toumeyia papyracantha* (Engleman, 1960), *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001) *Mammillaria rhodatha*, *Mammillaria compressa* (Hernández y García, 1991) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002) se ha reportado la presencia de triadas de megasporas donde la calazal es la funcional, dando origen a un gametofito monospórico, las megasporas restantes degeneran.

A partir de la megaspora calazal se desarrolla un saco embrionario de tipo Polygonum (Davis, 1966; Tiagi, 1970; Johri *et al.*, 1992).

Este tipo de saco embrionario es el que presenta la mayoría de las angiospermas y comprende siete células y 8 núcleos: un aparato del huevo

tricelular (dos sinérgidas y una ovocélula); tres células antípodas y una célula central binucleada (Bhojwani y Bhatnagar, 2000). Davis (1966) menciona que los núcleos polares de la célula central se fusionan antes de la fecundación.

Las sinérgidas se localizan hacia la zona micropilar del saco embrionario, se ha reportado que tienen forma de gancho como en *Opuntia dillenii*, *Mammillaria tenuis* (Maheshwari y Chopra 1955; Tiagi, 1957 citados en Tiagi, 1970; Davis, 1966), *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002). En las dos últimas especies también se reporta la presencia de un aparato filiforme. Así mismo, en *Pachycereus militaris* las sinérgidas presentan una vacuola en la región calazal y un núcleo hacia la región micropilar, sin embargo en *Pereskia lychnidiflora* la vacuola se ubica en la región micropilar y los núcleos hacia la calazal.

Por otro lado Jiménez (2002), reporta que en *Pereskia lychnidiflora* la ovocélula se ubica por arriba de las sinérgidas, presentando su núcleo hacia el micrópilo y su vacuola hacia la calaza.

En el caso de las células antípodas su localización es calazal, se caracterizan por ser células efímeras y pueden llegar a ser binucleadas (Davis, 1966; Tiagi, 1970; Johri *et al.*, 1992). En *Pachycereus militaris* sólo pueden observarse en etapas muy tempranas de la formación del saco embrionario (Núñez *et al.*, 2001). Tanto en *Mammillaria compressa* como en *Mammillaria rhodantha* las antípodas desaparecen cuando ocurre la fecundación (Hernández y García, 1991).

Es muy común observar la presencia de granos de almidón en el saco embrionario (Davis, 1966; Tiagi, 1970; Johri *et al.*, 1992) como en *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002), *Mammillaria compressa* y *Mammillaria rhodantha* donde se pueden observar en la célula central (Hernández y García, 1991). En *Pachycereus militaris* los granos de almidón se encuentran rodeando los núcleos polares (Núñez *et al.*, 2001).

El funículo, es un tejido que une al óvulo con la placenta del ovario y generalmente contiene el haz vascular. Usualmente es curvo y rodea parcialmente al óvulo, además puede presentar pelos funiculares o células

papilosas glandulares que forman un obturador (Tiagi, 1970; Corner, 1976). El funículo pueden ser simple o ramificado (Buxbaum, 1953).

El funículo de *Pachycereus militaris* es ramificado, circinótopo y presenta papilas en su parte ventral, el haz vascular que proviene del funículo llega hasta la cálaza (Núñez *et al.*, 2001). En *Astrophytum myriostigma* las células ventrales del funículo forman tricomas unicelulares. Así mismo es común encontrar granos de almidón en el funículo, mismos que se pierden días después de la fecundación al igual que los tricomas (Engleman, 1960). *M. compressa* y *M. rhodantha* presentan un funículo largo que puede curvarse y rodear parcialmente al óvulo, la superficie ventral está cubierta de papilas que se dirigen hacia el micrópilo formando el obturador, mismo que se presenta cuando el saco embrionario está completamente formado (Hernández y García, 1991).

En ciertos géneros como *Astrophytum*, *Thelocactus* y *Toumera* (Engleman, 1960) así como *Pereskia*, *Rhipsalis* y *Zygocactus* (Tiagi, 1970) existe una protuberancia o joroba en el lado dorsal del funículo junto a la unión con la cálaza, denominada joroba funicular. Núñez *et al.* (2001) reportan la presencia de joroba funicular en *Pachycereus militaris*.

Andróceo

Se ha documentado para algunas especies que los primordios de antera surgen del meristemo floral en forma centrífuga, tal es el caso de *Echinocereus reichenbachii* var. *albispinus*, *Pereskia corrugata*, *Opuntia engelmannii*, *Epiphyllum strictum* (Ross, 1982), *Mammillaria compressa* (Barthlott y Hunt, 1993), *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002).

Los numerosos estambres (ca. 20-4000) portan anteras de tipo bilobulado y tetraesporangiado. Los estambres pueden estar insertos en una serie como en *Pereskia* y *Rhipsalis* o distribuidos uniformemente sobre la parte interna inferior

del tubo hipantal como en *Rebutia* o pueden encontrarse en dos series separadas como en *Echinopsis* (Barthlott y Hunt, 1993).

Desarrollo de las anteras

Los primordios de antera constan de una masa homogénea de células que se encuentran limitadas por una protodermis bien definida. Durante su desarrollo la antera va adquiriendo una forma bilobulada (Bhojwani y Bhatnagar, 2000).

En cada lóbulo de la antera las células hipodérmicas se hacen prominentes y constituyen el arquesporio. Este último, generalmente consiste de una sola fila de células en cada microsporangio (Tiagi, 1970). Generalmente las células del arquesporio se dividen y dan origen al tejido parietal y al esporógeno; tanto la protodermis como el tejido parietal formarán la pared de la antera (Bhojwani y Bhatnagar, 2000).

La pared de la antera comprende la epidermis, endotecio fibroso, una capa media y un tapete secretor cuyas células son bi a tetranucleadas (Tiagi, 1970); los núcleos de estas últimas células comúnmente se fusionan (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992). No obstante, en una antera madura sólo dos capas persisten, la epidermis y el endotecio, el cual, presenta engrosamientos fibrosos constituidos por celulosa (Davis, 1966; Tiagi, 1970; Bhojwani y Bhatnagar, 2000).

Así mismo, se reporta que *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002) y *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002) presentan un desarrollo de pared de antera tipo monocotiledóneo, y su tejido conectivo se caracterizó por la presencia de drusas (cristales de oxalato de calcio).

Continuando con el desarrollo, las células esporógenas pasan a ser las células madres de las microsporas. Estas últimas se dividen meióticamente y cada una de ellas da origen a un agregado de cuatro microsporas haploides que se conocen como tétradas de microsporas. Las tétradas pueden ser tetraédricas y decusadas (Johri *et al.*, 1992). En el caso de *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002) y *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002) se reportan únicamente tétradas tetraédricas.

Barthlott y Hunt (1993), basándose en Leuenberger (1976), reportan que el polen consiste de mónadas isopolares y rara vez heteropolares (como en *Pseudorhizalis himntoclada*); los granos de polen pueden ser medianos (como en *Gymnocalycium* 36µm) hasta muy grandes (como en *Opuntia*, 120 µm) y su forma puede ser desde esferoidal hasta subprolada y rara vez suboblada (achatada de los polos); el número de aberturas es de 3, 6 ó 12, rara vez 15 ó más de 31; al polen con tres aberturas se le llama zonotrema; y con 6 ó más son pantotrema; las aberturas generalmente son colpadas y en muchas Opuntioideae son poradas. La exina es tectada a semitectada, la nexina posiblemente con endexina, la sexina se diferencia en columelas y tectum. Las columelas son del doble del tamaño del tectum y se distribuyen más o menos de modo uniforme o casi reticuloide. El tectum es perforado (puntado, anulopuntado, foveolado) a reticulado en muchas Opuntioideae, espinuloso y rara vez verrugoso o liso.

Davis (1966) y Johri *et al.* (1992) reportan que al momento de su liberación el grano de polen es tricelular.

Núñez *et al.* (2001) reportan que en *Pachycereus militaris* las anteras son dehiscentes antes de la anthesis y que el polen antes de ser liberado ya es tricelular, en esta especie los granos de polen son esferoidales, tricolpados, punctitegilados y equinulados. Jiménez (2002), reporta granos de polen tri y tetracolpados, tectados con perforaciones y con espínulas en *Pereskia lychnidiflora*.

Morfología de la semilla

En la familia Cactaceae la morfología de la semilla, el tamaño, la estructura y color de la testa (cubierta seminal), la conformación del hilo y el micrópilo, las características del embrión y de los tejidos almacenadores de sustancias nutritivas, muestran un alto nivel de diversidad que es de importancia para la sistemática (Bravo-Hollis, 1978; Barthlott y Voit, 1979).

Según Barthlott y Hunt (1993), la forma y simetría de las semillas en un plano lateral varía desde redonda-lenticular hasta la forma de sombrero, predominando la forma de "mejillón". En *Mammillaria rhodantha* se reporta que las semillas son piriformes y en *Mammillaria compressa* ovoides (Hernández y García, 1991).

En cuanto al tamaño de las semillas, éste varía desde 0.4 a 7.5 mm, aunque en *Pterocactus* la semilla alcanza los 12 mm, pero en promedio miden entre 1 y 2 milímetros (Barthlott y Hunt, 1993). Engleman (1960), reporta que las semillas de *Thelocactus bicolor*, *Toumeyia papyracantha* y *Astrophytum myriostigma* presentan un diámetro promedio de 1.7mm, 2.6mm y 2.2mm respectivamente. Las semillas están cubiertas por una testa que se origina del tegumento externo del óvulo. La testa varía en color, resistencia y ornamentación; sus colores más frecuentes son castaño, anaranjado, café y negro en diversas tonalidades. En el caso de *M. rhodantha* y *M. compressa* la semilla es de color pardo claro, en tanto que en *Astrophytum myriostigma* son de color rojo oscuro (Engleman, 1960; BravoHollis, 1978; Hernández y García, 1991; Barthlott y Hunt, 1993).

La testa puede ser rugosa ó lisa como en *Pereskia*, aunque puede presentar ornamentaciones que dependen de la forma de las paredes de las células de la capa externa, tales como engrosamientos, encogimientos, abultamientos o hundimientos que dan origen a estructuras reticuladas, corrugadas, foveoladas o tuberculadas. Por ejemplo la testa es corrugada en *Mammillaria tetrandra*, reticulada en *Coryphantha* y en algunas especies de *Mammillaria* y lisa en *Pachycereus* (Bravo-Hollis, 1978).

En *Pachycereus militaris* las células de la exotesta presentan paredes periclinales externas planas con límites celulares rectos y forma hexagonal y la superficie es lisa (Núñez *et al.*, 2001). En *Mammillaria rhodantha* y *Mammillaria compressa* estas células son alargadas en sentido micrópilo-calazal excepto en los extremos donde son isodiamétrica; también presentan una cutícula muy delgada (Hernández y García, 1991).

El hilo es la cicatriz que deja el funículo en la semilla madura al desprenderse, su forma, tamaño y posición son variables; en *Pereskia saccharosa* es grande, en

Astrophytum es tan grande que sobresale al diámetro del cuerpo de la semilla, en tanto que en *Mammillaria* es pequeño. El micrópilo es la abertura o poro que deja el tegumento interno (Bravo-Hollis, 1978). En algunos géneros el hilo y el micrópilo se encuentran separados por una banda de tejido esclerotizado de la testa como en los géneros *Pereskia* y *Echinocactus*. Sin embargo frecuentemente en Cactoideae los encontramos muy juntos o fusionados en un mismo complejo, formado así la región hilo-micropilar (Barthlott y Hunt, 1993). Dependiendo de la especie, el tamaño y forma de esta región varía, por ejemplo en *Mammillaria rhodantha* y *Mammillaria compressa* presenta una forma elíptica (Hernández y García, 1991). Engleman (1960) reporta que en *Thelocactus bicolor* su tamaño es muy pequeño.

Debido al encogimiento de las células funiculares, en la semilla madura se puede formar una copa hilar, en *Toumeyia papyracantha* ésta suele ser muy grande y se encuentra rodeada de células con paredes muy gruesas adyacentes a la nucela. En *Astrophytum myriostigma* la copa hilar se forma por el crecimiento y engrosamiento de la epidermis en la parte ventral, estas células delimitan la cavidad que alguna vez estuvo ocupada por el parénquima funicular (Engleman, 1960).

Es importante tener presente que los caracteres de la semilla se consideran muy estables, es decir, son muy poco modificados por los factores ambientales (Anderson, 2001).

El género *Mammillaria*

Este género pertenece a la subfamilia Cactoideae y a su vez a la tribu Cacteeae. (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Consta de 166 especies, de las cuales 160 se encuentran en México y de esa cantidad 150 son especies endémicas a este país, es por ello que el género *Mammillaria* se considera casi endémico de México (Hernández y Godínez, 1994).

El género *Mammillaria* parece ser una entidad heterogénea, dado que los grupos taxonómicos que lo integran presentan una variabilidad estructural en el tallo, flor y principalmente en la semilla, por lo cual se requiere de un

detallado estudio de campo que permita obtener más datos de su distribución, variabilidad y relaciones entre diferentes poblaciones y especies para lograr una revisión más completa del género (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Las especies que conforman este género se caracterizan por ser plantas pequeñas, simples o cespitosas. Su **tallo** es globoso-aplanado, cortamente cilíndrico y generalmente erecto. Se ramifica por brotes basales o laterales, contiene jugo acuoso o lechoso. Los **tubérculos** se disponen en series en espiral, 3 y 5, 5 y 8, 8 y 13, 13 y 21 o 21 y 34, son más ó menos numerosos con forma cónica-cilíndrica. Las **aréolas** son dimórficas, las espiníferas se localizan en el ápice de los tubérculos y poseen lana cuando jóvenes; las floríferas se localizan en la axila de los tubérculos y presentan lana.

Generalmente las **espinas** se diferencian en centrales y radiales, en ocasiones solo presentan centrales o radiales, son variables en número, forma, tamaño, color y disposición. Las **flores** se disponen en corona cerca del ápice, son pequeñas y/o grandes, con aspecto infundibuliforme o campanulado, de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura; el pericarpelo generalmente sin escamas; el tubo receptacular generalmente es corto sin escamas; segmentos del perianto escasos y dispuestos en una o varias series; anillo nectarial corto; estambres escasos, insertos desde el límite superior del anillo nectarial hasta la garganta; estilo delgado; lóbulos del estigma lineares. Los **frutos** son bayas pequeñas, claviformes de color rosado purpúreo hasta escarlata y conserva restos del perianto. Las **semillas** son pequeñas, más o menos globosas o piriformes, con testa reticulada, foveolada y de color castaño rojizo oscuro a negro; el embrión es ovoide o algo cilíndrico, muy succulento, con contiledones reducidos y perispermo reducido o ausente (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Distribución geográfica del género *Mammillaria*

Según Craig (1989), el género *Mammillaria* se distribuye principalmente en la República Mexicana, sin embargo algunas especies crecen en Colombia, Venezuela, Guatemala, Honduras, las Antillas y el sur de Estados Unidos.

En México se distribuyen principalmente en tres áreas:

- En las zonas más áridas de la meseta central, específicamente en Hidalgo, Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí.
- En el noreste de Sonora, Chihuahua y Sinaloa.
- En la península de Baja California e islas adyacentes.

Viabilidad de polen en el género *Mammillaria*

Para algunas especies del género *Mammillaria* se han reportado altos porcentajes de polen viable, en su mayoría todos mayores al 80%. Entre ellas se encuentran *M. abilanata* (82%), *M. baumii* (85%), *M. carmenae* (87%), *M. herrerae* (89%) (Mohanty *et al.*, 1996 citados en Briones, 2002), *M. spinosissima* (90%), *M. pectinifera* (92%), *M. auricantha* (89%) (Das *et al.*, 1999 citados en Briones, 2002), *M. crucigera* (97%) y *M. supertexta* (99%) (Briones, 2002).

Descripción botánica de *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada

Planta simple, rara vez con ramificaciones basítonas. **Tallo** globoso hasta cortamente columnar, de 6 a 12cm de altura y 4 a 7cm de diámetro; ápice ligeramente hundido, lanoso y cubierto por espinas. **Tubérculos** apretadamente dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, cónicos con la base oscuramente romboide, miden cerca de 7mm de alto y 4mm de diámetro basal, son de color verde, con jugo acuoso y están ocultos por las espinas. **Axilas** con abundante lana blanca que desaparece con el tiempo. Las **aréolas** son pequeñas, ovaladas, y cuando jóvenes presentan copiosa lana caduca, de color pálido amarillento. **Espinas radiales**, 18 a 20 finamente aciculares de 5 a 7 mm de largo, desde ligeramente encorvadas hasta retorcidas, son lisas semiflexuosas de color blanco vítreo, traslúcidas, con la base poco ensanchada, amarillenta, horizontalmente extendidas o algo adpresas; las 3 inferiores horizontalmente divergentes, las laterales 6 ó 7 a cada lado de la aréola, dispuestas en forma casi pectinada; las restantes 1 a 3 dispuestas en el ápice

de la aréola, divergentes y ligeramente ascendentes. **Espinas centrales** generalmente dos, rara vez una, delgadamente tubulada, de cerca de 5 a 6mm de longitud, lisas, tiesas, rectas, con la base ligeramente bulbosa, de color amarillo intenso, la superior porrecta o casi así, la inferior reflejada, de color blanco vítreo, a veces con la punta de color pardo a negruzco. **Flores** campanuladas, de 12 a 14mm la longitud, brotando en corona en la zona de transición de la parte cilíndrica del tallo a la redondeada del ápice; segmentos exteriores del perianto oblanceolados, agudos, enteros, de color castaño rosado con tintes verdosos hacia la base y purpúreos hacia el ápice, con la línea media más oscura; segmentos interiores del perianto linear oblongos, enteros, con el ápice desde obtuso hasta brevemente acuminado, de color carmesí rosado; filamentos blanco amarillentos; anteras amarillas; estilo blanco amarillento, a veces con tinte rosado; lóbulos del estigma 3 ó 4, blanco amarillentos. **Fruto** claviforme, rojo. **Semilla** encorvado-piriforme; testa de color castaño amarillento. Endémica del Distrito Federal, en la parte Sur del Valle de México. Localidad tipo: Pedregal de San Ángel, donde crece en rocas basálticas del derrame de lava del Volcán Xitle (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Descripción botánica de *Mammillaria haageana* Pfeiffer

Tallo simple o a veces cespitoso desde la base, globoso hasta cilíndrico, de 6cm de altura por 4cm de diámetro; ápice redondeado, con el centro hundido. **Tubérculos** apretadamente dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, cónico-piramidales, cuadrilaterales, de 5mm de altura y 3mm de espesor en la base, de consistencia firme, de color verde azulado, con jugo acuoso. **Axilas** con lana blanca flocosa, con el tiempo desnudas. **Aréolas** ovales, de 2 a 3mm de diámetro, al principio con lana blanca, después desnudas. **Espinas radiales** 18 a 20, de 3mm de longitud, delgadamente aciculares, rectas a ligeramente encorvadas, blancas, lisas, ligeramente arqueado-ascendentes. **Espinas centrales** 2, de 6 a 8mm le longitud, siendo la inferior más larga, fuertemente aciculares, ligeramente encorvadas, de color castaño a negro, divergentes

hacia arriba y hacia abajo. **Flores** laterales, infundibuliformes, de 12mm de longitud; segmentos exteriores del perianto lineares, con el ápice desde agudo hasta obtuso y el margen finamente aserrado, con la base de color crema verdoso muy pálido, los bordes de color castaño amarillento pálido y la franja media castaño amarillento rosado; segmentos interiores del perianto lineares, con ápice obtuso y el margen casi entero, de 2mm de ancho, de color rosa purpúreo, hacia arriba con una línea media más oscura y la base blanco verdosa; filamentos casi blancos abajo y rosados arriba; anteras amarillas; estilo crema abajo y rosado arriba; lóbulos del estigma 3, de color verde oliva pálido. **Fruto** cilíndrico-claviforme, de 1cm de longitud y 4 m de diámetro, rojo arriba y rosado hacia la base, conservando adheridos los restos secos del perianto. **Semillas** encorvado-piriformes, de 1mm de longitud, con hilo lateral cerca de la base, de color castaño oliváceo. Se distribuye en el estado de Veracruz. Localidad tipo: desconocida. Señalada por Pfeiffer en Perote y cerca de Orizaba, Veracruz (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Cabe mencionar que ambas mamilarias eran consideradas especies distintas (Bravo-Hollis y Sánchez-mejorada, 1991), pero en 1999 Hunt las reclasificó, incluyendo a ambas especies en la super-especie *Mammillaria haageana*, de tal forma que ahora se consideran *Mammillaria haageana* subsp. *haageana* y *Mammillaria haageana* subsp. *san-angelensis*. Esta última se sigue considerando una especie en peligro de extinción (Guzmán *et al.*, 2003). En este sentido, muchos de los datos reportados para ambas mamilarias en la presente tesis podrían servir a los taxónomos y por ello, están a su disposición.

Puesto que una de las causas que puede provocar la ausencia de frutos y semillas en *M. san-angelensis* es el desarrollo anormal de sus estructuras reproductoras, se tomó la decisión de estudiarlas. Además, se compararon con las de *M. haageana*, suponiendo que en ésta última presentan un desarrollo normal, dado que es una especie silvestre y sí produce frutos y semillas viables.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si en el desarrollo de las estructuras reproductoras de *M. san-angelensis* (planta propagada *in vitro*) se puede encontrar una explicación a la falta de producción de frutos y semillas.

Objetivos Particulares

- Comparar la morfología externa de la flor de *M. san-angelensis* y *M. haageana*.
- Comparar el desarrollo del gineceo y el óvulo en *M. san-angelensis* y *M. haageana*.
- Comparar el desarrollo del androceo y los granos de polen en *M. san-angelensis* y *M. haageana*.
- Comparar la micromorfología de las semillas y los granos de polen de *M. san-angelensis* y *M. haageana*.
- Determinar y comparar la viabilidad de los granos de polen de *M. san-angelensis* y *M. haageana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se trabajó con dos especies del género *Mammillaria* de la serie Supertextae *Mammillaria san-angelensis* y *Mammillaria haageana* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Los ejemplares utilizados de ambas especies, forman parte de la colección de cactáceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM (Figs. 1- 4).

Originalmente *Mammillaria haageana* fue colectada por el Biólogo Jerónimo Reyes en la localidad de Perote, Veracruz (com. pers.). Los individuos de *Mammillaria san-angelensis* forman parte del lote de plantas que se obtuvieron por la propagación *in vitro* de ésta especie y fueron donados a la colección en 1990 por el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM (Figs. 5 y 6).

Colecta

Se colectaron botones florales en diferentes etapas de desarrollo y flores en anthesis de *Mammillaria san-angelensis* y *Mammillaria haageana*. Este material fue fijado en FAA (formol, ácido acético, alcohol 96%, agua destilada, 1:0.5:5:3.5) (López *et al.*, 1998).

Flores en anthesis de ambas especies fueron conservadas en fresco para realizar una prueba de viabilidad de polen y para comparar el color de los tépalos, empleando la tabla de colores "Methuen Handbook of Colour".

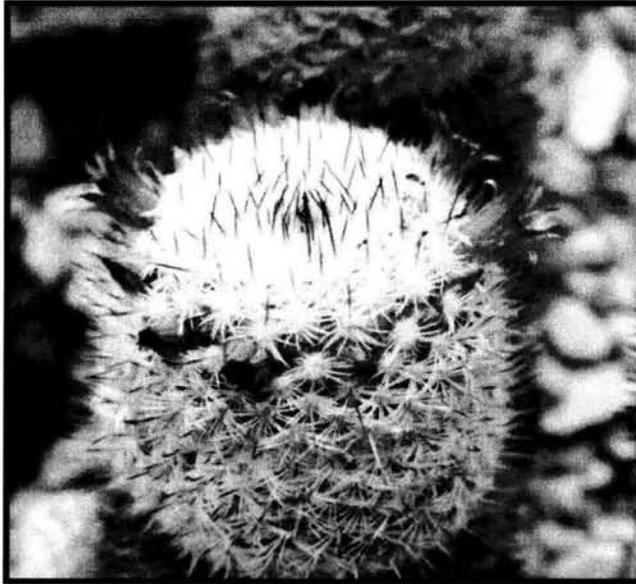


Fig. 1 . *Mammillaria san-angelensis* en floración



Fig. 2. *Mammillaria haageana* en floración



Fig. 3. Mapa del Jardín Botánico del IB-UNAM



Fig. 4. Casa de sombra. Lugar donde se encuentran la mayor parte de las especies que forman la colección de Cactáceas de Jardín Botánico IB-UNAM

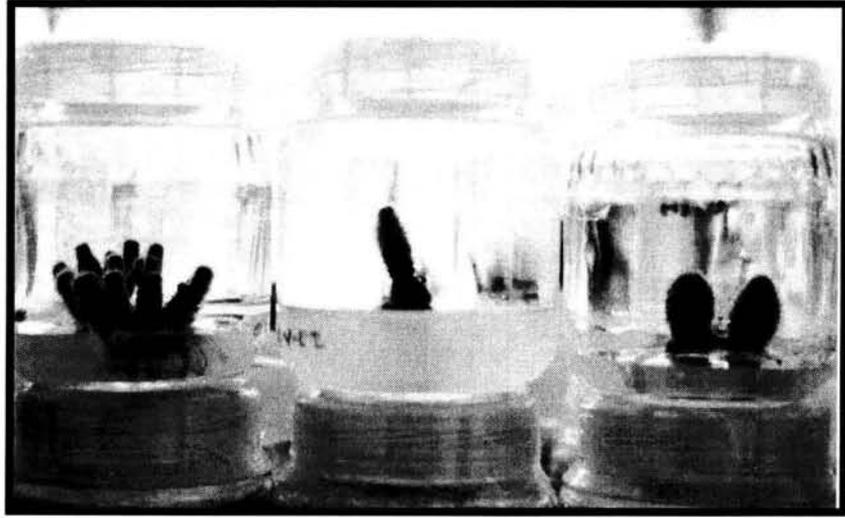


Fig. 5. *Mammillaria san-angelensis* cultivada *in vitro*.



Fig. 6. Cultivos *in vitro* de *Mammillaria san-angelensis* en condiciones ambientales controladas.

Inclusión en Paraplast (López *et al.*, 1998)

Las flores en antesis y preantesis fijadas en FAA, fueron deshidratadas con etanoles graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%, 100%) durante dos horas cada uno, posteriormente se colocaron por 15 minutos en Xilol puro para después dejarlas 12 horas en una mezcla de Xilol-parafina (1:1), finalmente se colocaron en Paraplast puro durante 24 horas a 56° C.

Las muestras se cortaron a un grosor de 7µm empleando un microtomo de rotación.

Los cortes se desparafinaron colocándolos en la estufa a 56°C durante 45-60min. Inmediatamente después se expusieron a 3 cambios de xilol, uno de xilol-etanol 100% (1:1), etanol 100% y etanol 96% durante 3 minutos cada uno.

Finalmente las muestras fueron teñidas con una tinción doble de safranina-verde rápido en metilcelosolve

Disección de material para su inclusión en resinas

Para facilitar su inclusión en resinas, parte del material fijado en FAA fue disectado. Se realizaron cortes transversales tanto de los botones como de las flores en antesis, separando el ovario del resto de la flor. Posteriormente se hizo un corte lateral a ambos segmentos dejando expuestos a los óvulos y anteras.

Pre-tinción de material para su inclusión en resinas

La pre-tinción se llevó a cabo para facilitar la observación y orientación de las estructuras al momento de incluirlas y cortarlas.

El material disectado se enjuagó con agua para eliminar el fijador (FAA). Posteriormente se sumergió en azul de toluidina al .5% (Anexo 1.) durante 45 minutos.

Inclusión en LR-WHITE (LRW) (Ruzin, 1999)

El material preteñido con azul de toluidina fue deshidratado con etanoles graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%, 100%) durante dos horas cada uno. Posteriormente se pasaron por una serie gradual de LRW-etanol 100% en proporciones 1:3, 1:1 y 3:1 durante 60 minutos cada uno. Enseguida se hicieron 2 cambios de LRW puro, permaneciendo 1 hora cada uno. El material fue incluido en cápsulas de gelatina transparentes del número 4 y 5 (debido a que la resina polimeriza en ausencia de oxígeno), a una temperatura de 56° C durante 6 h.

Las muestras fueron cortadas con cuchillas de vidrio a un grosor de 1µm - 2.5µm empleando un ultramicrotomo y se tiñeron con azul de toluidina al .5%.

Inclusión en JB-4 (López, *et al.*, 1998)

El material disectado y preteñido con azul de toluidina, fue deshidratado con acetonas graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100% y 100%) durante 2 horas cada una. Después las muestras se colocaron en una mezcla de Componente A + Catalizador durante 12 horas mínimo. Se realizó una mezcla de Componente A + Catalizador + Componente B, las muestras fueron incluidas en tabletas de inclusión y se colocaron en una cámara de vacío durante 8-12 h.

Las muestras se cortaron con cuchillas de vidrio a un grosor de 1-2.5µm empleando un ultramicrotomo y fueron teñidas con azul de toluidina al .5%.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Del material fijado en FAA se seleccionaron ovarios, óvulos, granos de polen, estigmas y estilos para ser observados en el MEB. Las muestras fueron deshidratadas con etanoles graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) durante 2 horas cada uno. Posteriormente se llevaron a punto crítico con CO₂ en una desecadora Bal-tec CPD 030 y se colocaron en portamuestras para ser cubiertas con una capa muy delgada de oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Finalmente las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-5310LV y se tomaron las micrografías electrónicas necesarias. De igual manera las semillas ya secas, fueron procesadas para su observación al MEB.

Prueba de Viabilidad de Polen (Alexander, 1980)

Los granos de polen obtenidos del material fresco de ambas especies fueron sometidos a la prueba de Alexander. El polen fue colocado en varios portaobjetos y después de aplicar una gota de tinción de Alexander en cada uno, se sometieron por 3 segundos al calor de una flama. Inmediatamente después se tomaron microfotografías de las muestras. Una preparación con granos de polen hervidos durante un minuto, sirvió como testigo. Se realizaron conteos del número de granos de polen viables y no viables. En total se observaron con el microscopio óptico 14 campos diferentes a un aumento de 10X para cada una de las especies. Con estos datos se determinaron las proporciones de viabilidad.

RESULTADOS

FLOR

Las flores de *Mammillaria san-angelensis* al igual que las de *Mammillaria haageana* presentan simetría radial, los sépalos y pétalos no se encuentran bien diferenciados. Por presentar ambos verticilos sexuales son flores hermafroditas (Figs. 9 y 10).

La forma de la flor en ambas especies es campanulada y llegan a medir en promedio entre 10 y 12 mm de largo. Los segmentos del perianto (tépalos) en *Mammillaria san-angelensis* son de color magenta y en *Mammillaria haageana* son color rosa de acuerdo a la tabla de colores. "Methuen Handbook of Colour" (Figs. 7 y 8). Sin embargo, en ambos casos los segmentos externos del perianto presentan una ligera tonalidad verde. Las flores presentan un pericarpelo desnudo (Fig. 11).

Androceo

El número promedio de estambres en *M. san-angelensis* es de 76 y en *M. haageana* 75. Los filamentos de las anteras en su parte más basal se encuentran fusionados formando una cámara nectarial (Figs. 9 y 10). En ambas especies los filamentos presentan una ligera tonalidad rosa y las anteras son amarillas.

Gineceo

El gineceo de *M. san-angelensis* puede presentar 3, 4 ó 6 carpelos, siendo el de 3 carpelos el más común. En *M. haageana* encontramos gineceos formados por 2, 3 ó 4 carpelos, siendo el de 4 el más frecuente.



Fig. 7. Flor de *M. san-angelensis*



Fig. 8. Flor de *M. haageana*

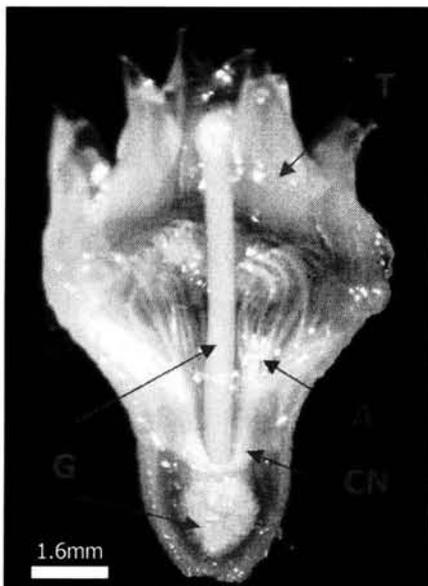


Fig. 9. Corte longitudinal de flor de *M. san-angelensis*. T, tépalos; A, androceo; G, gineceo; CN, cámara nectarial.

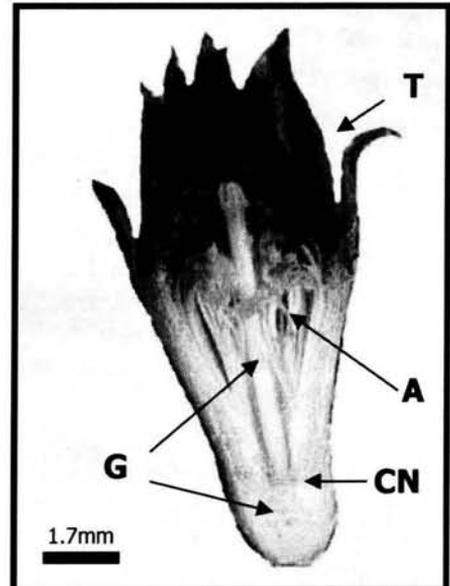


Fig. 10. Corte longitudinal de flor de *M. haageana*. T, tépalos; A, androceo; G, gineceo; CN, cámara nectarial.

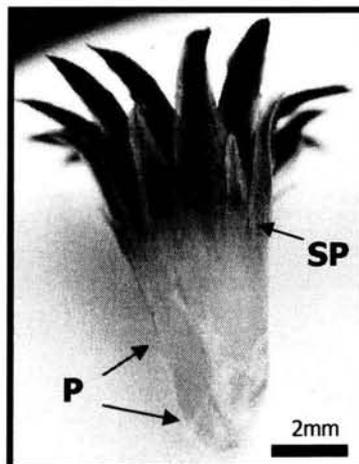


Fig. 11. Flor en antesis de *M. san-angelensis*. P, pericarpelo desnudo; SP, Segmentos externos del perianto.

En ambas especies los carpelos se encuentran fusionados formando un ovario unilocular, donde se observa que la placentación de los óvulos es parietal (Figs. 12-15). El ápice de los carpelos es libre formando un estigma, el número de lóbulos estigmáticos coincide con el número de carpelos y haces vasculares presentes a lo largo del estilo (Figs. 16a – 23a; 16c – 21c).

Tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana* se observó que los estilos son sólidos desde la base hasta la parte media, pero en el extremo cercano al estigma se pudo observar un canal en la parte central del tejido de transmisión. Cabe mencionar que la presencia de este canal ocurre desde etapas de desarrollo muy tempranas y se conserva durante toda la vida del estilo (Figs. 16b -21b; 22c -23c; 16d – 21d; 22d, 23d, 22e y23e).

Los estigmas son papilosos y los lóbulos estigmáticos son triangulares. Las papilas cubren toda la superficie adaxial de los lóbulos y parte de la abaxial puesto que la franja intermedia de esta última superficie carece de ellas (Figs. 16a – 23a; 22b, 23b y 24).

Megasporogénesis y megagametogénesis

En *M. san-angelensis* y *M. haageana*, los primordios de óvulos surgen de la pared interna del ovario (placenta) y constan de un tejido homogéneo rodeado por una protodermis uniforme (Fig. 25). El tejido indiferenciado da origen a la nucela y la protodermis a la epidermis nucelar.

Algunas células de la protodermis nucelar comienzan a dividirse anticlinal y periclinalmente dando origen al tegumento interno. Por ello se considera que su origen es dermal en ambas especies. El óvulo comienza a curvarse debido al crecimiento asimétrico de éste tegumento, es decir, en la parte dorsal ocurren más divisiones que en la ventral (Figs. 26 y 27).

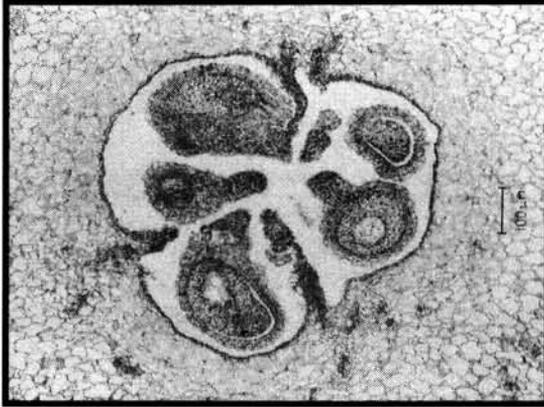


Fig. 12. Corte transversal de ovario unilocular-tricarpelar con placentación parietal de *M. san-angelensis*. (Campo claro 25X)

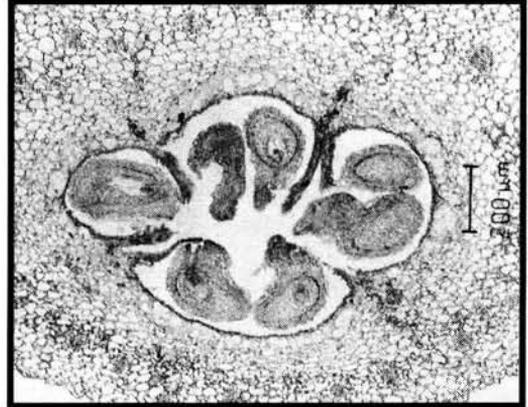


Fig. 13. Corte transversal de ovario unilocular-tetracarpelar con placentación parietal de *M. haageana*. (Campo claro 18X)

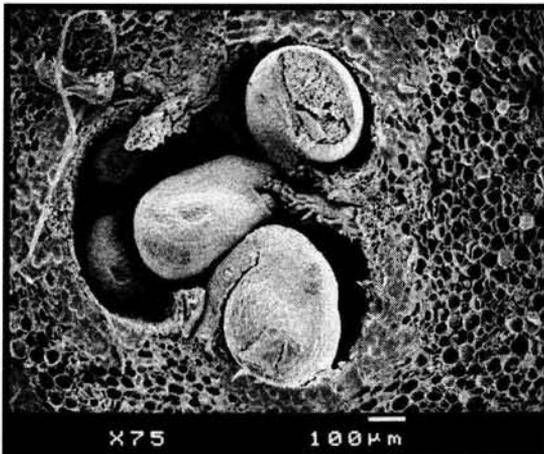
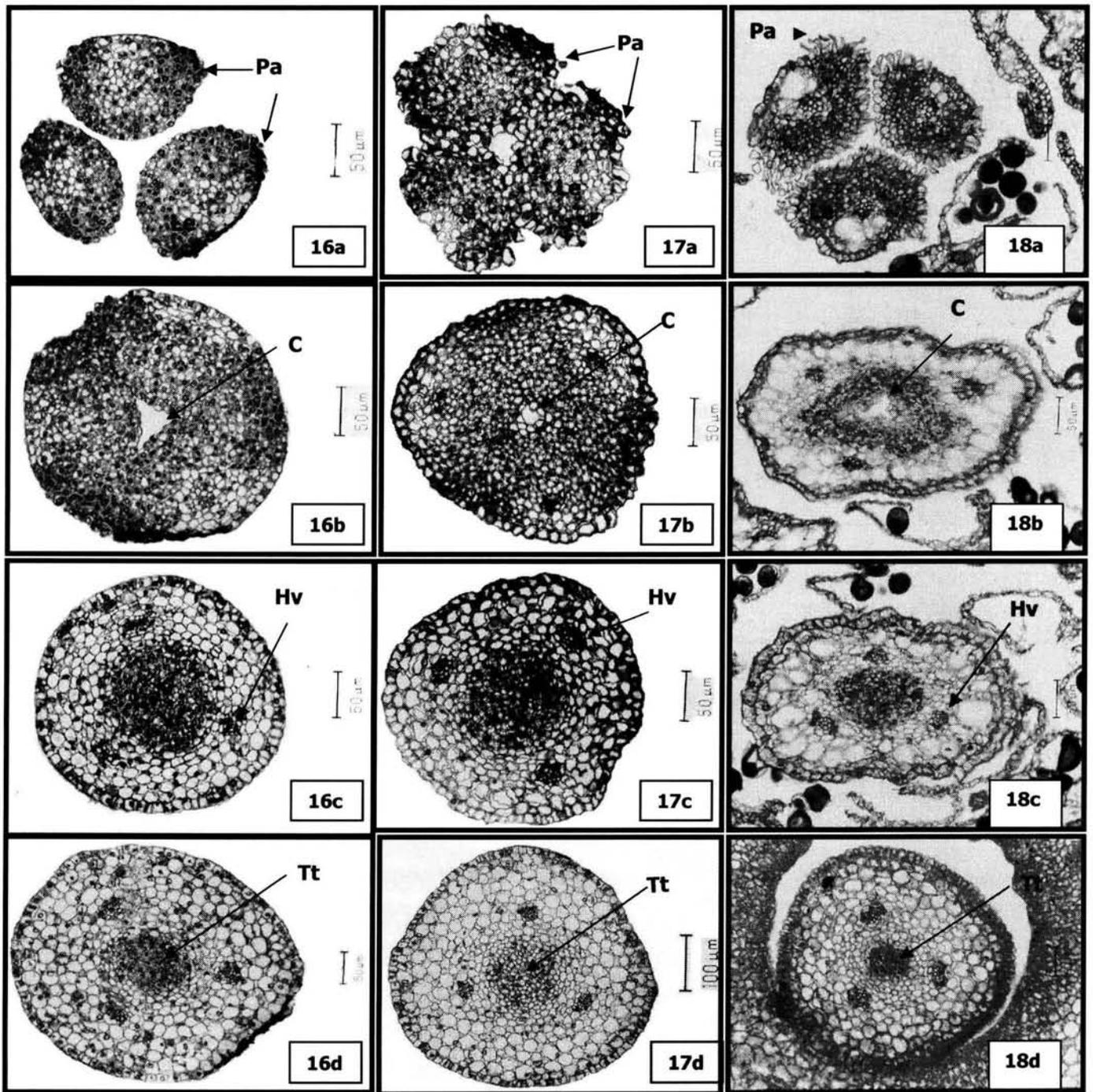


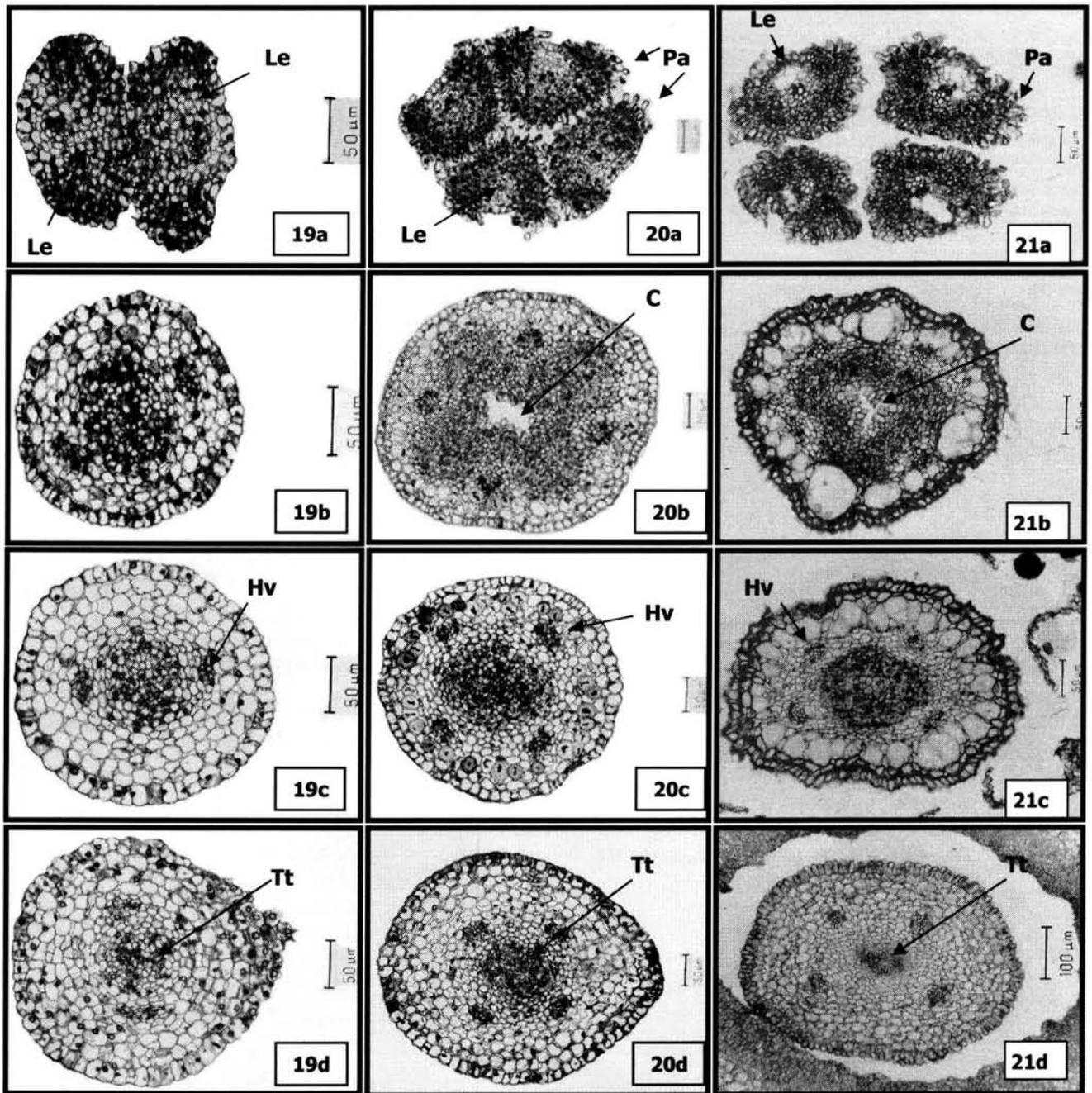
Fig. 14. Corte transversal de ovario de *M. san-angelensis*. Se observa la placentación parietal de los óvulos. (MEB)



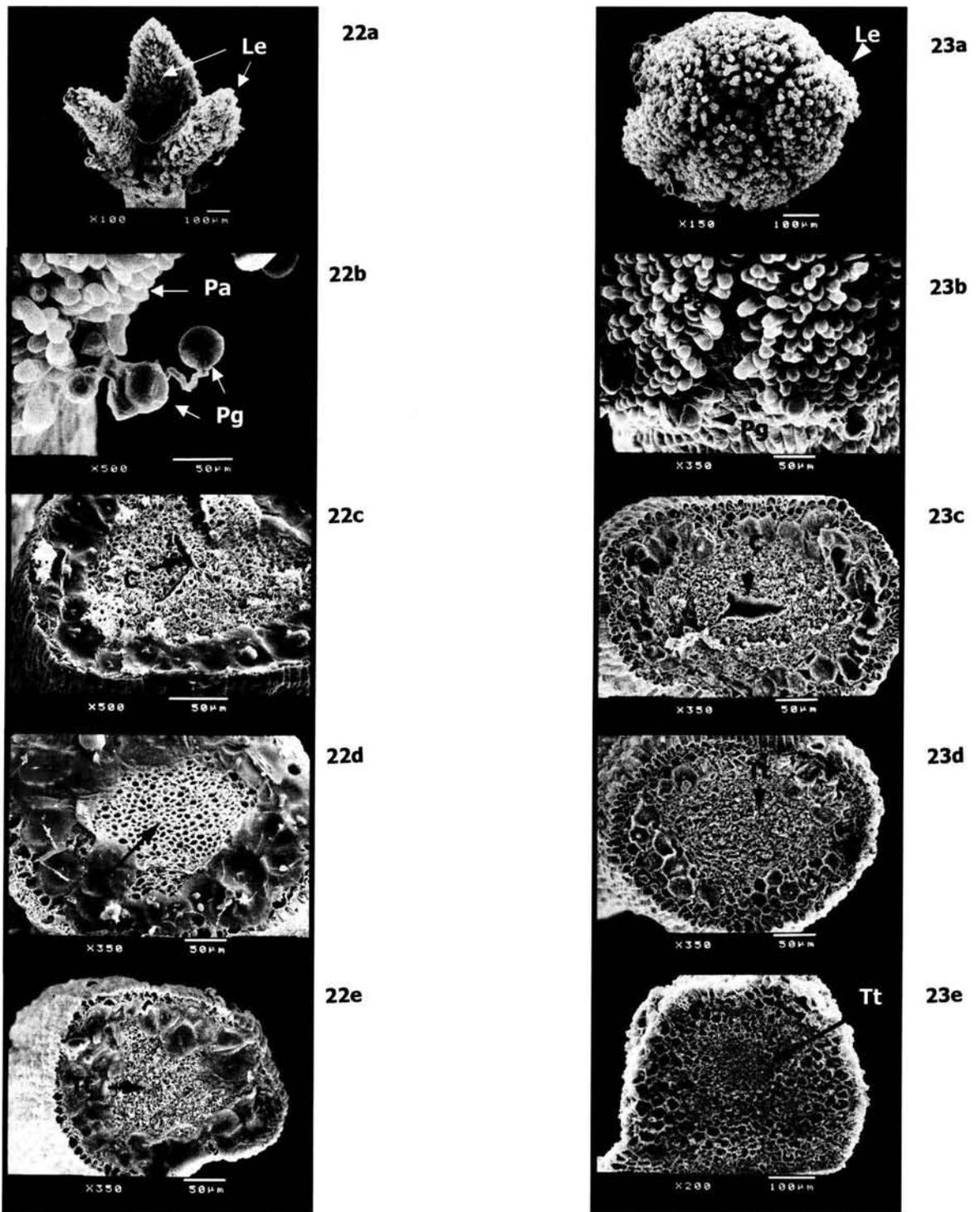
Fig. 15. Corte transversal de ovario de *M. haageana*. Se observa la placentación parietal de los óvulos. (MEB)



Figs. 16a-d, 17a-d y 18a-d. Secuencia de cortes transversales de estilo y estigma de *M. san-angelensis* en diferentes etapas de desarrollo. En 16a - 18a se observa el estigma trilobular y papiloso; en 16b, 17b y 18b se observa el estilo en su parte más cercana al estigma, es notable la presencia de un canal en el tejido de transmisión; en 16c - 18c se muestra la sección media del estilo, se observan completamente sólidos y presentan tres haces vasculares; en 16d - 18d se muestra la sección del estilo más cercana al ovario, se observa que continúa siendo sólido. Figs. 16a-d pertenecen a un botón de 2.9mm de long.; 17a-d corresponden a un botón de 4.5 mm long. y 18a-d a una flor preantética. (Campo claro) **Le**: lóbulo estigmático, **Pa**: papilas, **C**: canal estilar, **Tt**: tejido de transmisión, **Hv**: haz vascular.



Figs. 19a-d, 20a-d y 21a-d. Secuencia de cortes transversales de estilo y estigma de *M. haageana* en diferentes etapas de desarrollo. En 19a se observa un estigma bilobular, en 20a y 21a se observa el estigma tetralobular y papiloso; en 19b - 21b se observa el estilo en su parte más cercana al estigma, solo en 20b y 21b es notable la presencia de un hueco en el tejido de transmisión; en 19c - 21c se muestra la sección media del estilo, se observan completamente sólidos y presentan dos, cuatro y cuatro haces vasculares respectivamente; en 19d - 21d se muestra la sección del estilo más cercana al ovario, se observa que continúa siendo sólido. Figs. 19a-d pertenecen a un botón de 2.78mm de long.; 20a-d corresponden a un botón de 5.52 mm long. y 21a-d a una flor preantética. (Campo claro) **Le:** lóbulo estigmático, **Pa:** papilas, **C:** canal estilar, **Tt:** tejido de transmisión, **Hv:** haz vascular.



Figs. 22a. y 23a. Estigma trilobular y tetralobular .Se observa la forma triangular de los lóbulos estigmáticos. **Figs. 22b y 23b. Acercamiento de la superficie lobular** . Se muestra la presencia de papilas y granos de polen germinando. **Figs. 22c. y 23c. Corte transversal de estilo en su región más próxima al estigma.** Es notable la presencia de una cavidad en el tejido de transmisión. **Figs. 22d. Y 23d. Corte transversal de estilo en su parte media.** Se observa un estilo sólido. **Figs. 22e. Y 23e. Corte transversal de estilo en su parte más cercana al ovario.** Se observa que el estilo continua siendo sólido. (MEB) **Le:** lóbulo estigmático, **Pa:** papilas, **C:** canal estilar, **Tt:** tejido de transmisión, **Pg:** polen germinando.

Nota: Las figuras 22 a-e y 23 a-e muestran una secuencia de estigma-estilo de una flor en antesis de *M. san angelensis* y *M. haageana* respectivamente.

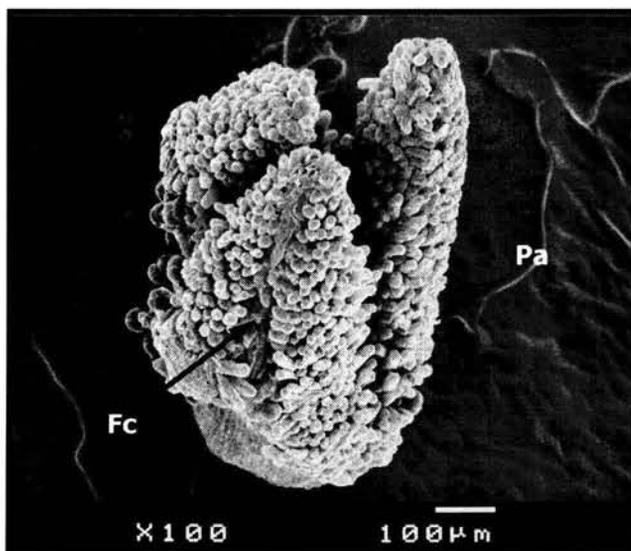


Fig. 24. Estigma trilobular de *M. san-angelensis*. Toda la superficie estigmática esta cubierta por papilas (**Pa**) excepto en la franja central (**Fc**) de la cara abaxial del lóbulo. (MEB)

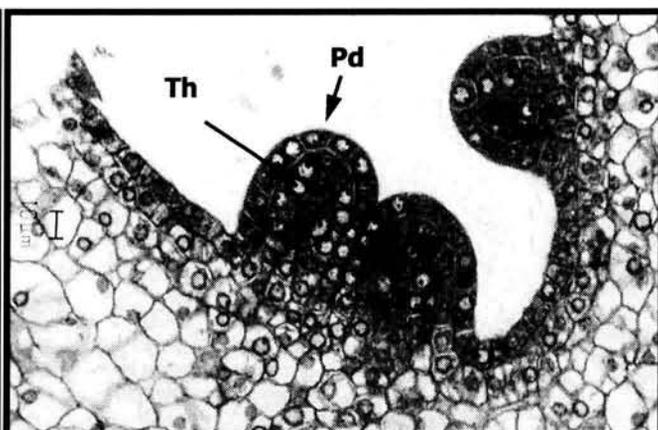


Fig. 25. Corte longitudinal de primordios de óvulos de *M. san-angelensis*. Se observa el tejido homogéneo (**Th**) y la protodermis (**Pd**). Botón de 2.9mm de longitud. (Campo claro - 100X)

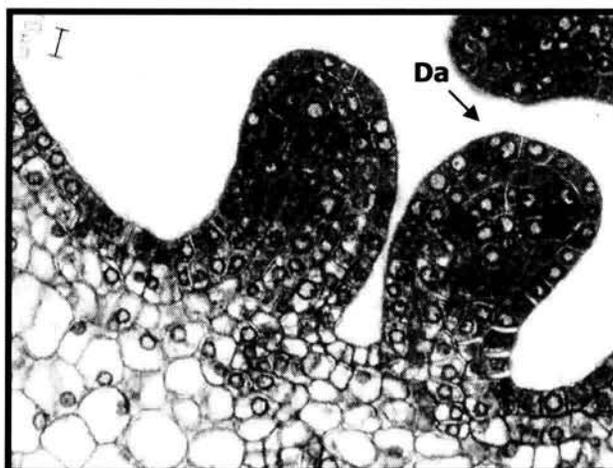


Fig. 26. Corte longitudinal de primordios ovulares de *M. san-angelensis*. Se observa la división anticlinal de las células protodérmicas (**Da**) que dará origen a lo tegumento interno. Botón de 2.9mm de longitud. (Campo claro-150X)

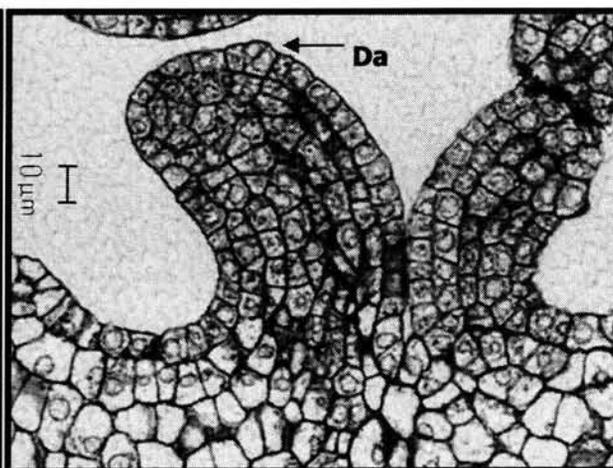


Fig. 27. Corte longitudinal de primordios ovulares de *M. haageana*. Se observa la división anticlinal de las células protodérmicas (**Da**) que darán origen al tegumento interno. Botón de 2.6mm de longitud. (Campo claro-150X)

Posteriormente el tegumento externo también comienza a diferenciarse y la curvatura del óvulo incrementa (Figs. 28 y 29).

Una vez que comenzó la diferenciación de los tegumentos, debajo de la protodermis nucelar se diferencia la célula arquesporial, la cual se divide periclinalmente formando una célula parietal (externa y adyacente a la protodermis) y una célula esporógena (interna). Esta última al quedar en posición sub-hipodérmica produce un óvulo con nucela masiva, tipo crasinucelado en ambas especies (Figs. 30 y 31).

La célula esporógena pasa a ser directamente la célula madre de las megasporas, incrementando su tamaño y presentando un núcleo conspicuo y citoplasma denso. En esta etapa los tegumentos ya han aumentado notablemente su tamaño, el tegumento interno ha crecido hasta sobrepasar la longitud de la nucela y el tegumento externo apenas la cubre. Ambos tegumentos son biestratificados, sin embargo el tegumento interno en la zona micropilar es pluriestratificado. En ambas especies, la curvatura del óvulo ha incrementado tanto que el micrópilo se encuentra cerca del funículo y en este último han comenzado a surgir las células del obturador (Figs. 32 y 33).

En *M. san-angelensis* la célula madre de las megasporas se divide meióticamente y forma una triada lineal de megasporas. La megaspóra funcional es la que se encuentra en posición calazal (Figs. 34 a y b), ésta da origen a un saco embrionario monospórico, las dos megasporas restantes degeneran (Fig. 34b). Esta etapa no se pudo observar en *M. haageana*, solamente encontramos la diada (Fig. 35).

Al inicio de la formación del saco embrionario comienza a hacerse evidente un espacio entre el tegumento interno y el externo en *M. san-angelensis* (en la zona dorsal) (Figs. 36 a y b). En *M. haageana* este espacio es muy evidente y también se presenta un espacio entre la nucela y el tegumento interno hacia el extremo calazal (Fig. 37).

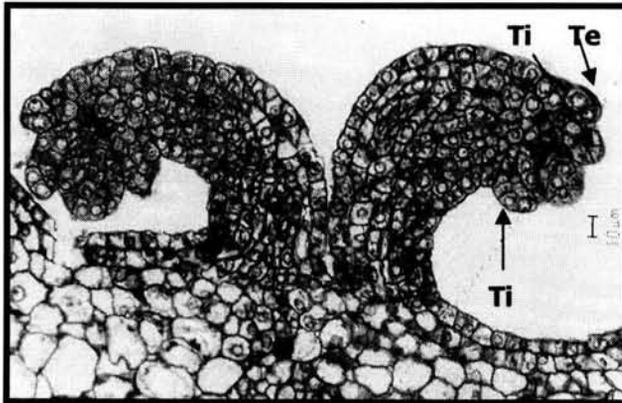


Fig. 28. Corte longitudinal de óvulos de *M. san-angelensis*. Se observa la diferenciación de los tegumentos y la pronunciada curvatura del óvulo. **Ti**, tegumento interno; **Te**, tegumento externo. Botón de 4mm de longitud. (Campo claro- 100X)

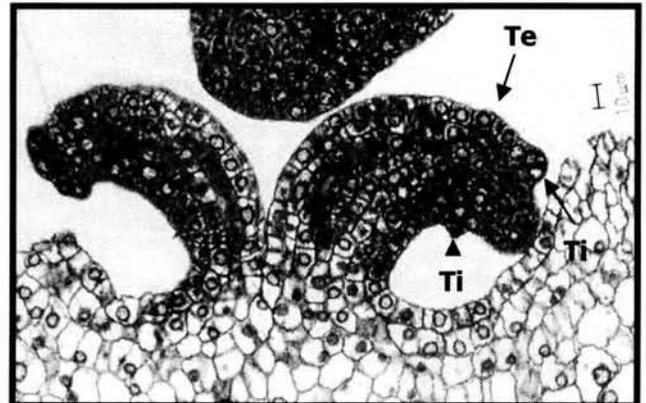


Fig. 29. Corte longitudinal de óvulos de *M. haageana*. Se observa la diferenciación del tegumento interno y el inicio del externo. Es evidente la curvatura que presentan los óvulos. **Ti**, tegumento interno; **Te**, tegumento externo. Botón de 2.78mm de longitud. (Campo claro-100X)

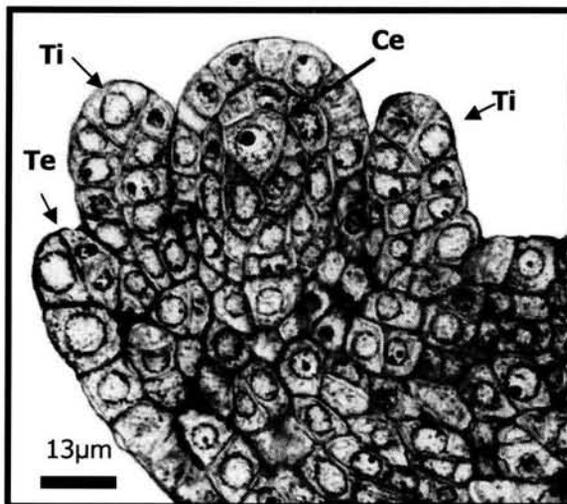


Fig. 30. Corte longitudinal de óvulo de *M. san-angelensis*. Se observa la célula esporógena en posición sub-hipodérmica. Los tegumentos continúan diferenciándose. **Ce**, célula esporógena; **Ti**, tegumento interno; **Te**, tegumento externo. Botón floral de 4mm de longitud.(Campo claro- 250X)

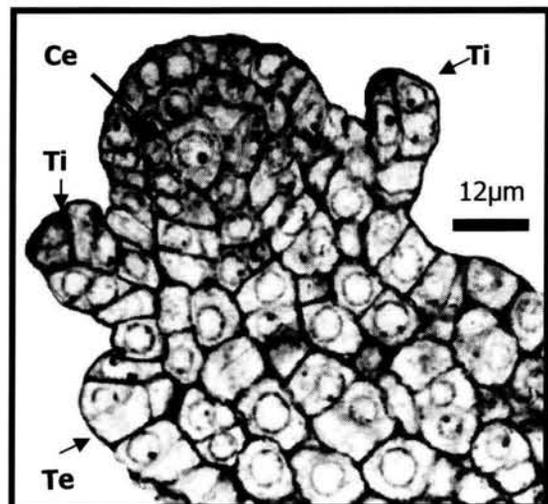


Fig. 31. Corte longitudinal de óvulo de *M. haageana*. Se observa la célula esporógena en posición sub-hipodérmica. Los tegumentos continúan diferenciándose. **Ce**, célula esporógena; **Ti**, tegumento interno; **Te**, tegumento externo. Botón de 2.73mm de longitud. (Campo claro- 250X)

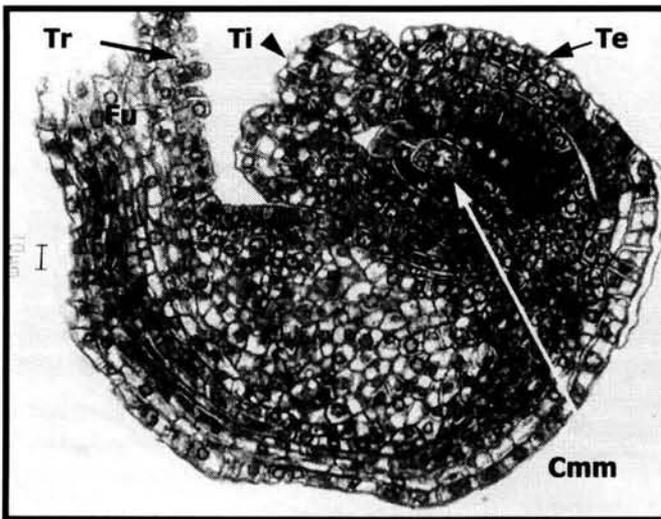


Fig. 32. Corte longitudinal de óvulo de *M. san-angelensis*. Célula madre de las megasporas (**Cmm**), los tegumentos son biestratificados, en la región micropilar el tegumento interno (**Ti**) se pluriestratifica, del funículo (**Fu**) surgen tricomas (**Tr**). Tegumento externo (**Te**). Botón de 4.5mm de longitud. (Campo claro- 100X)

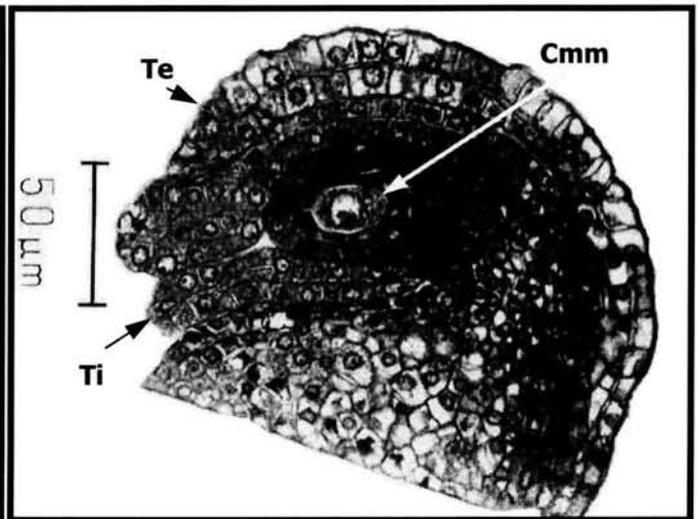


Fig. 33. Corte longitudinal de óvulo de *M. haageana*. Se observa la célula madre de las megasporas (**Cmm**), cada tegumento consta de 2 estratos celulares, en la región micropilar el tegumento interno (**Ti**) se pluriestratifica. Tegumento externo (**Te**). Botón de 6.49mm de longitud.(Campo claro- 90X)

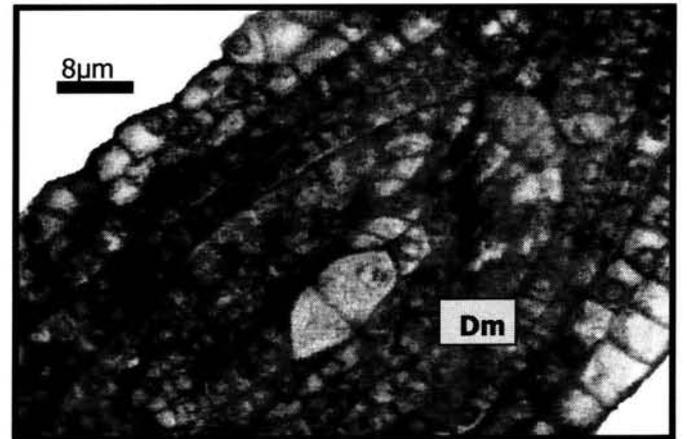
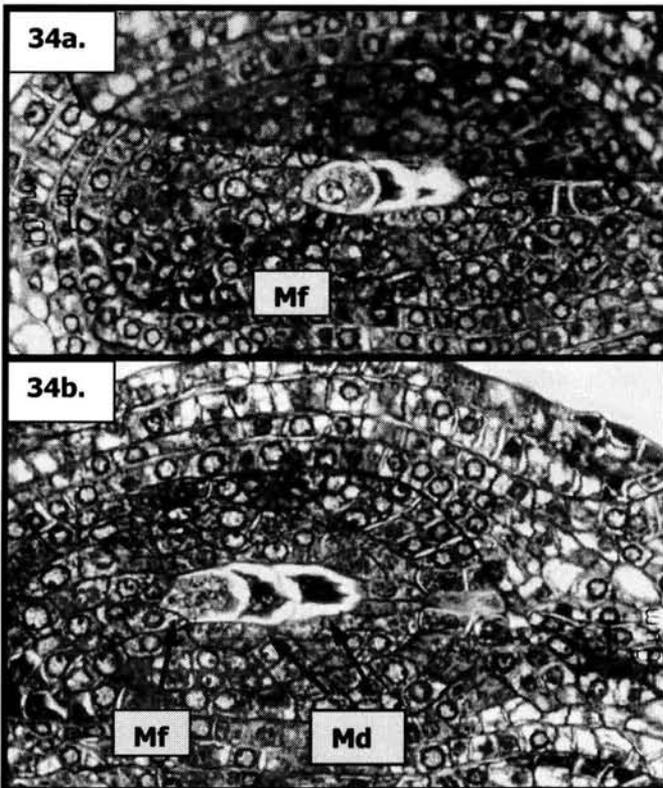
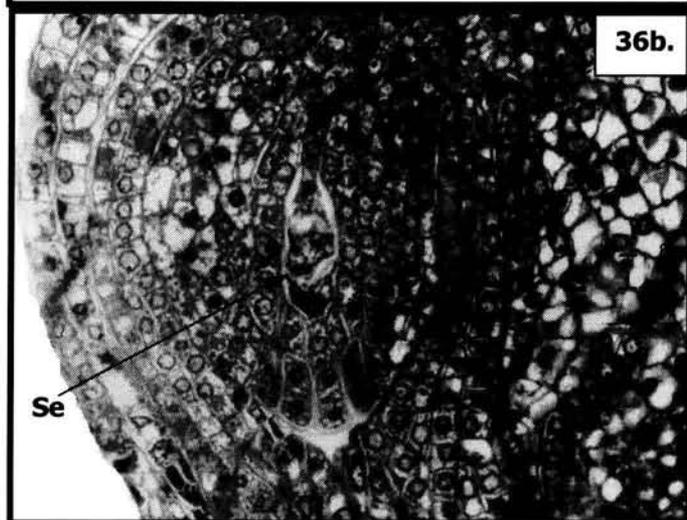
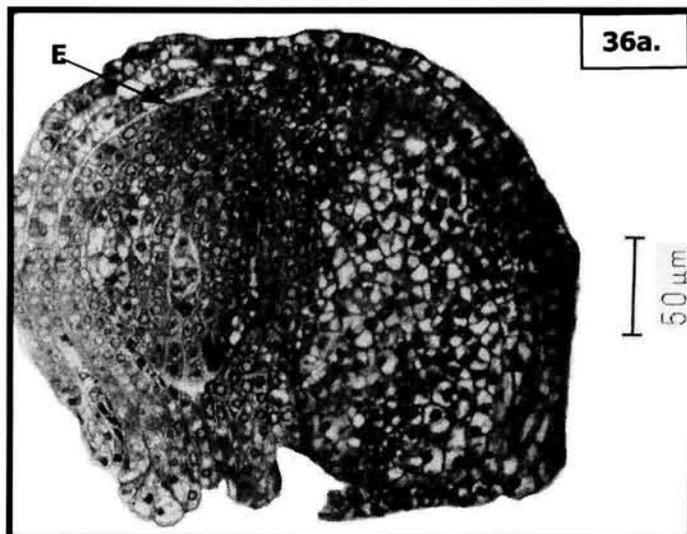


Fig. 35. Corte longitudinal de óvulo de *M. haageana*. Se observa una diada de megasporas (**Dm**) . (Campo claro- 170X)

Figs. 34a y b. Secuencia de cortes longitudinales de óvulo de *M. san-angelensis*. Se observa la triada de megasporas, la funcional es la calazal (**Mf**) y las otras dos degeneran (**Md**). Botón de 5.5mm de longitud. (Campo claro- 150X)



Figs. 36a y b. Corte longitudinal de óvulo de *M. san-angelensis*. Se observa el inicio de la formación del saco embrionario (**Se**). Surge un pequeño espacio entre los tegumentos en la zona dorsal (**E**). Botón de 5.5mm de longitud. (Campo claro- 36a. 75X; 36b 150X.)

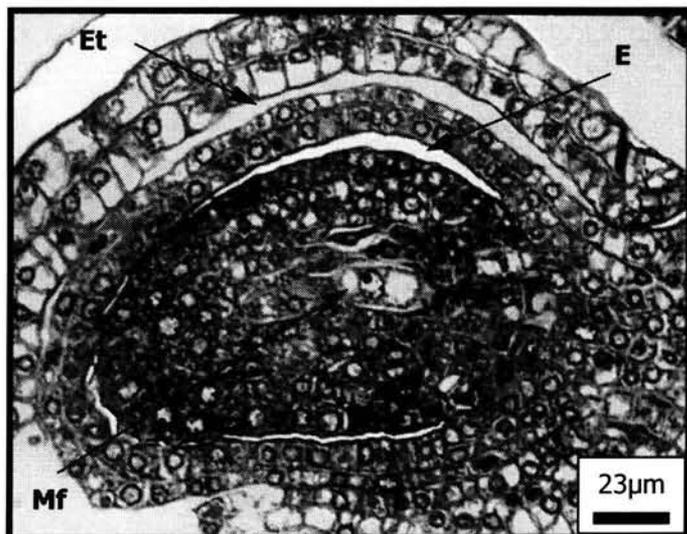


Fig. 37. Corte longitudinal de óvulo de *M. haageana*. La megaspora funcional aumentó de tamaño y su núcleo es conspicuo (**Mf**). Surge un espacio entre los tegumentos (**Et**), es evidente otro espacio entre el tegumento interno y la nucela (**E**). Botón de 6.9mm de longitud. (Campo claro- 155X)

En las dos especies, las antípodas no se lograron observar, parecen ser efímeras desde etapas muy tempranas del desarrollo del saco embrionario.

Por la degeneración temprana de las antípodas, el saco embrionario en flores preantéticas consta sólo de 4 células y 5 núcleos. El aparato del huevo se localiza en el extremo micropilar del saco embrionario y lo conforman dos sinérgidas y una ovocélula (Fig. 38). Las sinérgidas en *M. san-angelensis* tienen forma triangular pero en *M. haageana* son romboides, en ambas especies éstas presentan una vacuola hacia la zona calazal y el núcleo se localiza hacia la región micropilar (Figs. 39 y 40). La ovocélula en las dos especies, se observa justo arriba de las sinérgidas y los núcleos polares de la célula central se observan justo en la parte media del saco embrionario (Fig. 41, 42 a-b y 43 a-c).

En *M. san-angelensis* se observó que en esta etapa aumenta el espacio intertegumentario y se hace evidente un espacio entre la nucela y el tegumento interno, esto ocurre sólo hacia el extremo calazal (Fig. 44). Al llegar la antesis, estos espacios se hacen aún más evidentes (Fig. 45).

En la antesis, antes de que ocurra la fecundación, los núcleos polares se aproximan al aparato del huevo para fusionarse posteriormente (Figs. 42 a y b; 43 a, b y c).

En ambas especies, el funículo ya presenta células alargadas en su parte ventral que forman el obturador (Figs. 46 y 47). Las sinérgidas presentan un aparato filiforme (Figs. 48 y 49). El óvulo presenta una evidente protuberancia funicular (Figs. 46 ,47 ,50 y 51).

El espacio intertegumentario y el que se presentaba entre la nucela y el tegumento interno disminuyen considerablemente. El óvulo maduro es campilótropo, endóstomo y crasinucelado.

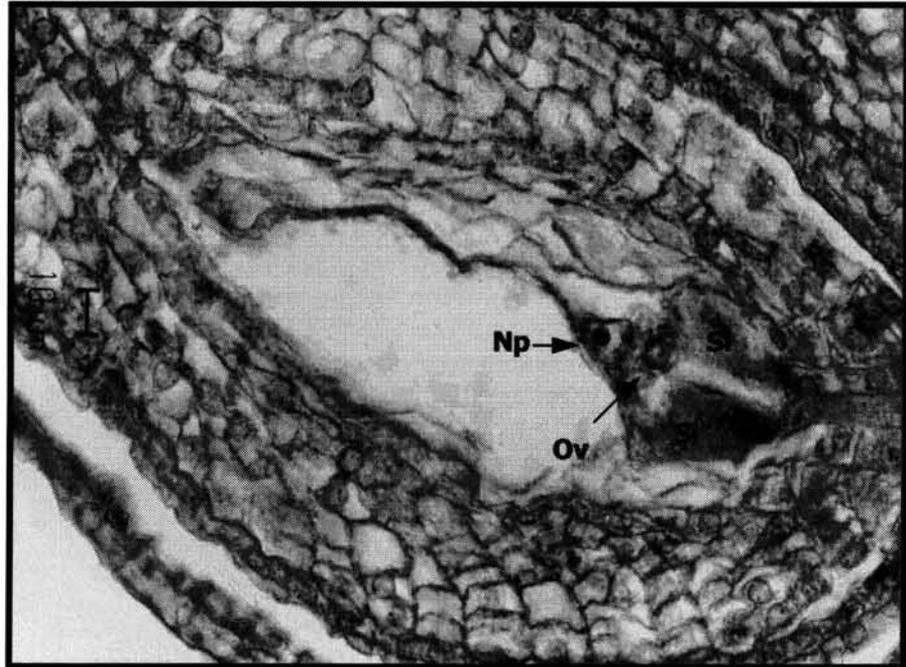


Fig. 38. Corte longitudinal de saco embrionario de *M. san-angelensis* en antesis. Hacia el extremo micropilar del saco embrionario, se observan dos sinérgidas (**Si**), la ovocélula (**Ov**) y un núcleo polar (**Np**). (Campo claro- 150X)

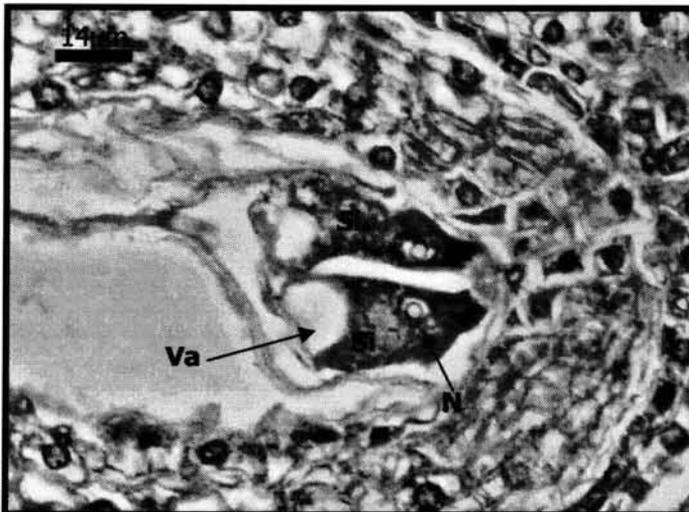


Fig. 39. Corte longitudinal de sinérgidas de *M. san-angelensis* en antesis. Se observan dos sinérgidas triangulares (**Si**), presentan su núcleo (**N**) hacia el extremo micropilar y una gran vacuola (**Va**) en posición opuesta. (Contraste de fases- 200X)

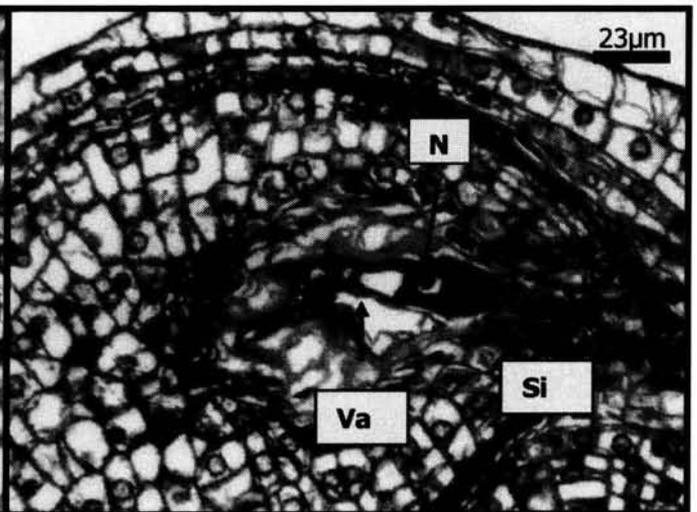


Fig. 40. Corte longitudinal de sinérgida de *M. haageana* en preantesis. Sinérgida con forma romboide (**Si**) presenta su núcleo (**N**) hacia el extremo micropilar y una gran vacuola (**Va**) en posición opuesta. (Campo claro- 171X)

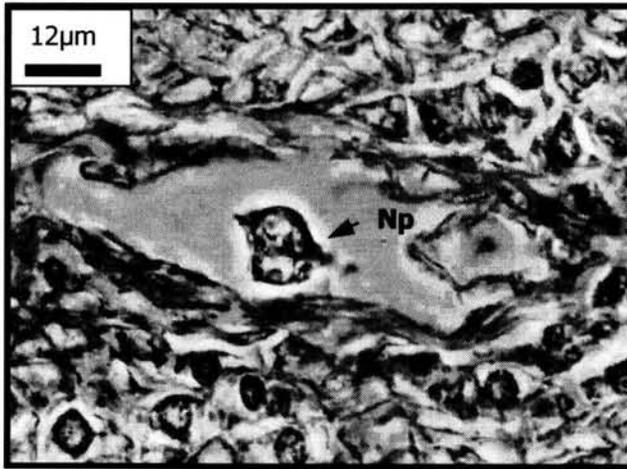
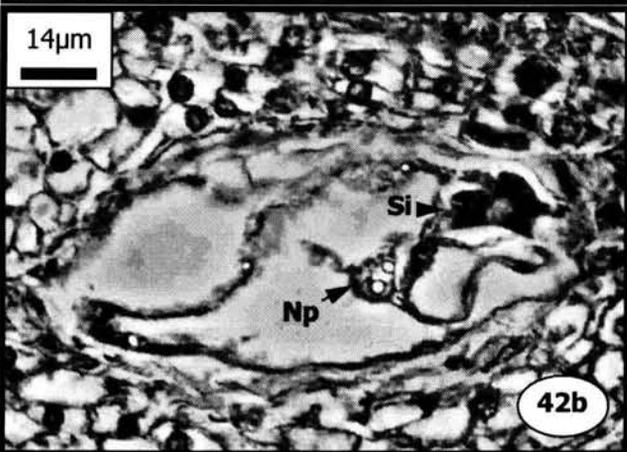
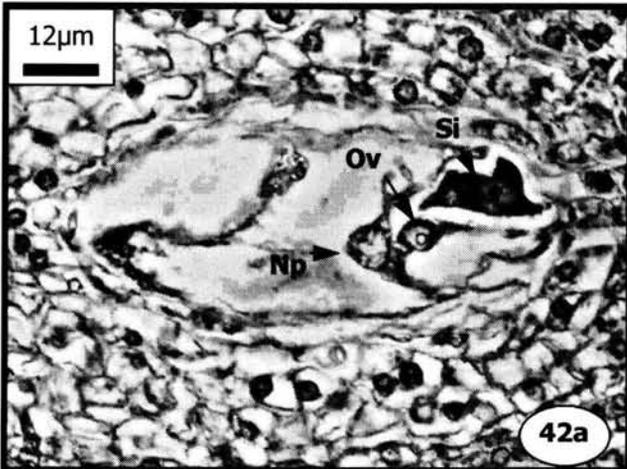
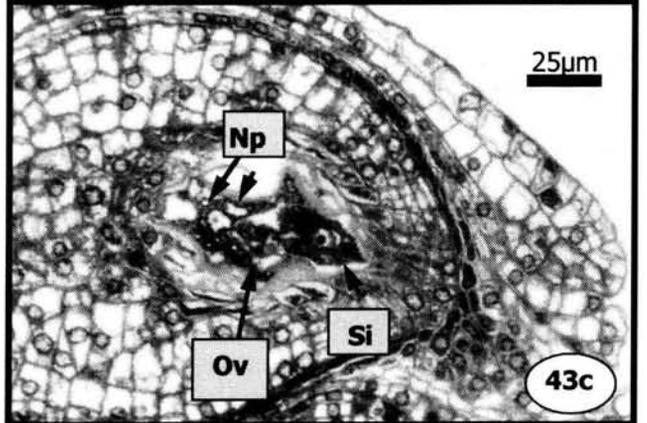
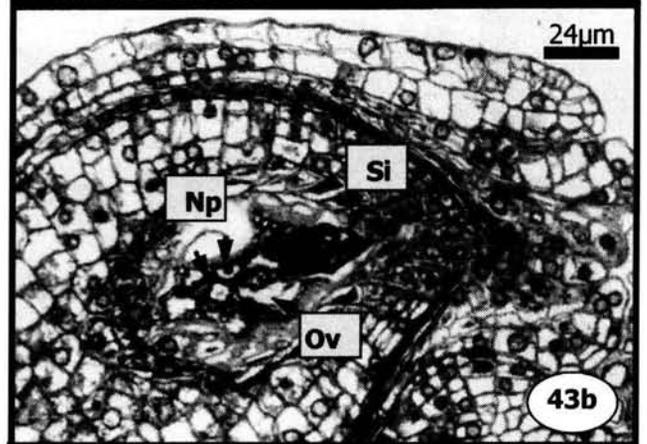
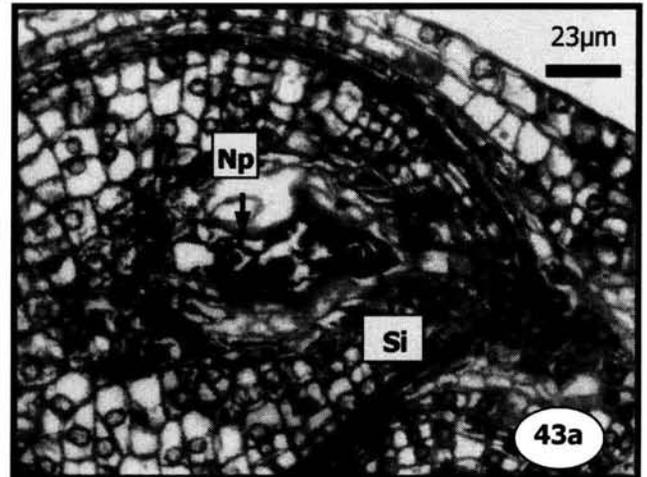


Fig. 41. Corte longitudinal de saco embrionario de *M. san-angelensis* en preantesis. Núcleos polares (Np) en la parte media del saco embrionario. (Contraste de fases-250X)



Figs. 42a. Y 42b. Secuencia de cortes longitudinales de saco embrionario de *M. san-angelensis* en antesis. Se observa una sinérgida (Si) y la ovocélula (Ov). Los núcleos polares (Np) se aproximan al aparato del huevo. (Contraste de fases- 250X)



Figs. 43 a, b y c. Secuencia de cortes longitudinales de saco embrionario de *M. haageana* en preantesis. Se observa una sinérgida (Si), los núcleos polares (Np) y la ovocélula (Ov). (Campo claro- 171X)

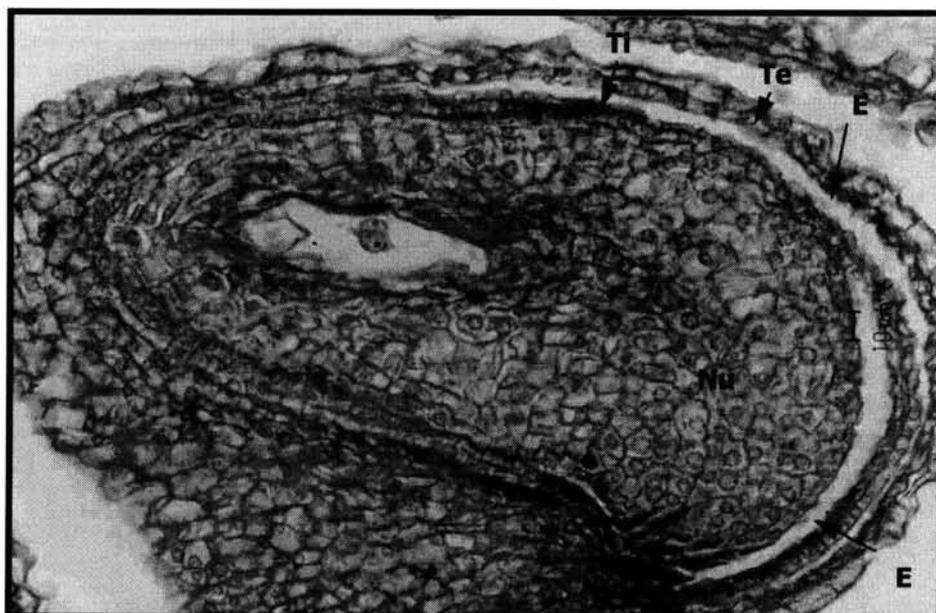


Fig. 44. Corte longitudinal de óvulo de *M. san-angelensis* en preantesis. Se observa un espacio (E) entre la nucela (Nu) y el tegumento interno (Ti) y también entre el tegumento interno (Ti) y el externo (Te). (Campo claro- 100X)

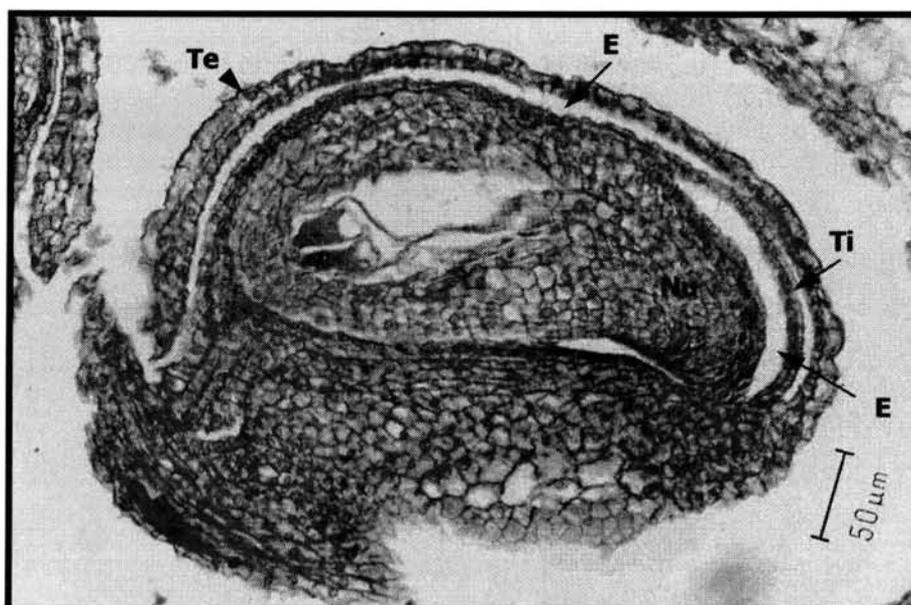


Fig. 45. Corte longitudinal de óvulo de *M. san-angelensis* en antesis. Se observa un espacio (E) entre la nucela (Nu) y el tegumento interno (Ti) y también entre el tegumento interno (Ti) y el externo (Te) hacia el extremo calazal. (Campo claro- 62X)

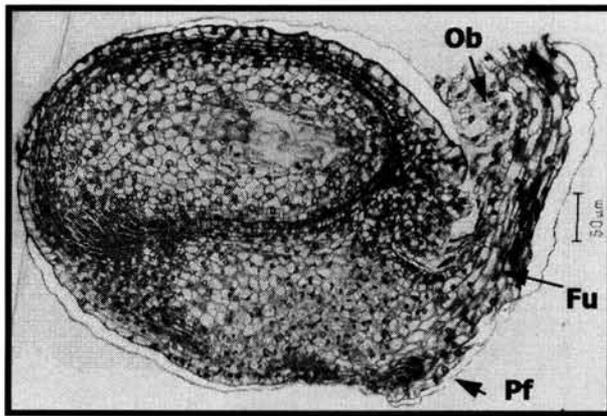


Fig. 46. Corte longitudinal de *M. san-angelensis* en antesis. Se observa un óvulo campilótropo, el funículo (**Fu**) presenta obturador (**Ob**). Es evidente la protuberancia funicular (**Pf**). (Campo claro- 50X)

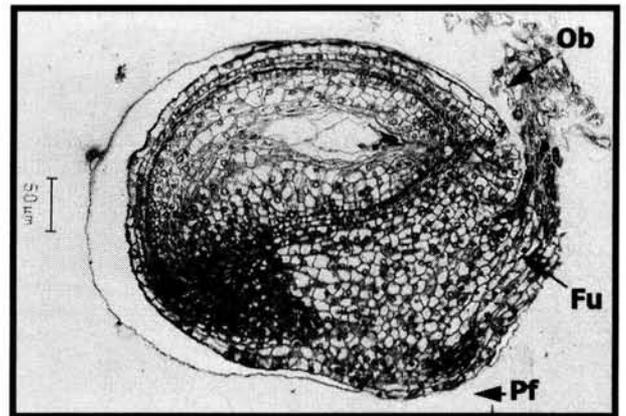


Fig. 47. Corte longitudinal de *M. haageana* en antesis. Se observa un óvulo campilótropo, el funículo (**Fu**) presenta obturador (**Ob**). Es evidente la protuberancia funicular (**Pf**). (Campo claro- 50X)

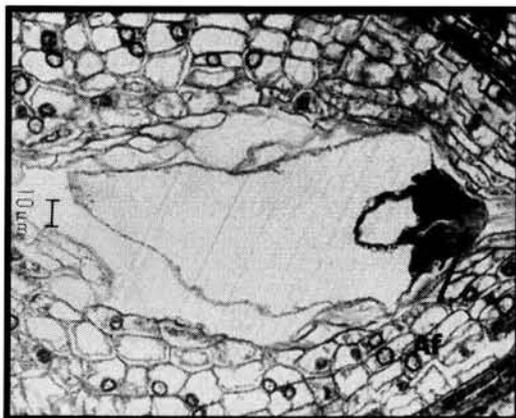


Fig. 48. Corte longitudinal de sinérgidas de *M. san-angelensis* en antesis. Ambas sinérgidas presentan aparato filiforme (**Af**). (Campo claro- 150X)

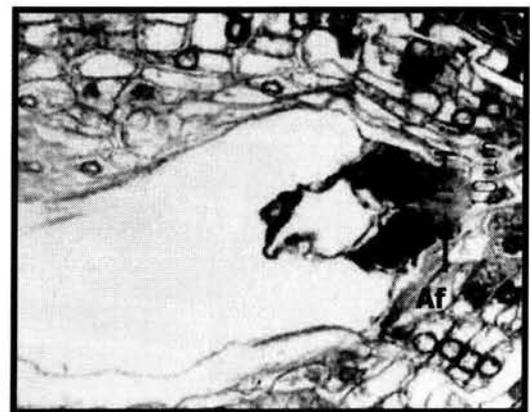


Fig. 49. Corte longitudinal de sinérgidas de *M. haageana* en antesis. Ambas sinérgidas presentan aparato filiforme (**Af**). (Campo claro- 150X)

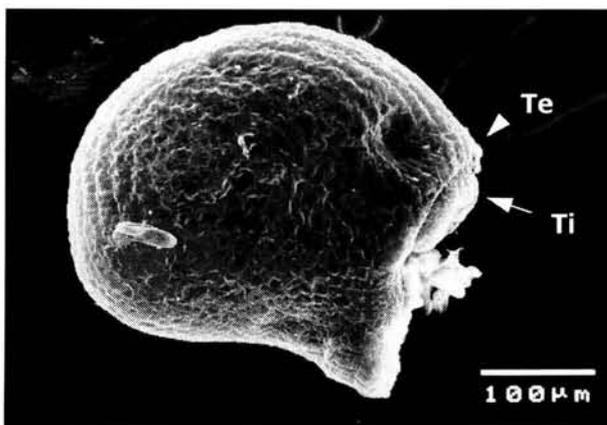


Fig. 50. Vista lateral de óvulo maduro de *M. san-angelensis*. Se observan el tegumento interno (**Ti**) y externo (**Te**). (MEB 200x)

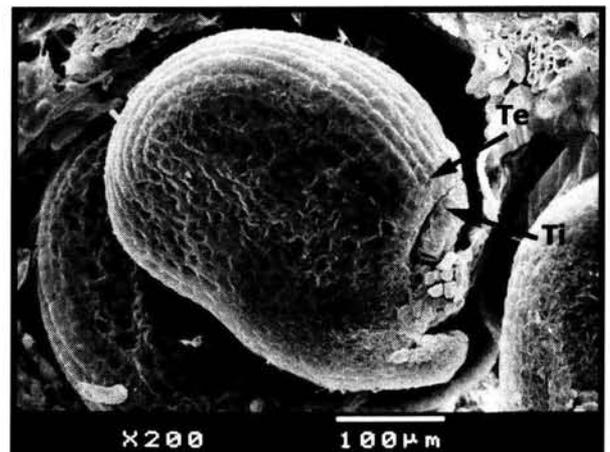


Fig. 51. Vista lateral de óvulo maduro de *M. haageana*. Se observan el tegumento interno (**Ti**) y externo (**Te**). (MEB)

Microsporogénesis y microgametogénesis

Tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana*, durante las primeras etapas de desarrollo de la antera las células arquesporales delimitadas por una protodermis, comienzan a dividirse periclinalmente dando origen a las células parietales primarias y a las células esporógenas. Las primeras quedan cerca de la epidermis y las segundas hacia el interior del microsporangio (Figs. 52 y 53). Más tarde las células parietales primarias a su vez se dividen periclinalmente dando lugar a una capa de células parietales secundarias externas y a otra de células parietales secundarias internas. Mientras tanto, las células esporógenas destacan por el incremento de tamaño, su citoplasma denso y núcleos conspicuos (Figs. 52 y 53). En esta etapa podemos observar la presencia de algunos cristales de oxalato de calcio (drusas) en el tejido conectivo.

Posteriormente la capa parietal secundaria interna se divide periclinalmente originando una capa media y el tapete (Figs. 54 y 55). Es por ello que se considera que el tipo de desarrollo de la pared de la antera para ambas especies es de tipo monocotiledóneo.

En las dos especies, la capa parietal secundaria externa da origen directamente al endotecio. Por lo tanto, la pared de la antera joven consta de cuatro capas celulares: la epidermis, el endotecio, una capa media y el tapete.

Durante la formación de la pared de la antera, las células esporógenas aumentan su tamaño y se dividen mitóticamente dando origen a las células madres de las microsporas (Figs. 56 y 57).

En esta etapa, tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana*, la antera ya tiene bien diferenciados sus cuatro esporangios. El número de drusas en el conectivo incrementa.

Posteriormente, las células del tapete aumentan su tamaño y su citoplasma se observa muy denso, es entonces cuando se dividen mitóticamente pero no ocurre formación de pared, es decir, hay cariocinesis sin citocinesis. Por consiguiente, en las dos especies las células del tapete son binucleadas. Para este momento la capa media ya comenzó a constreñirse y se hace poco evidente (Figs. 58 y 59).

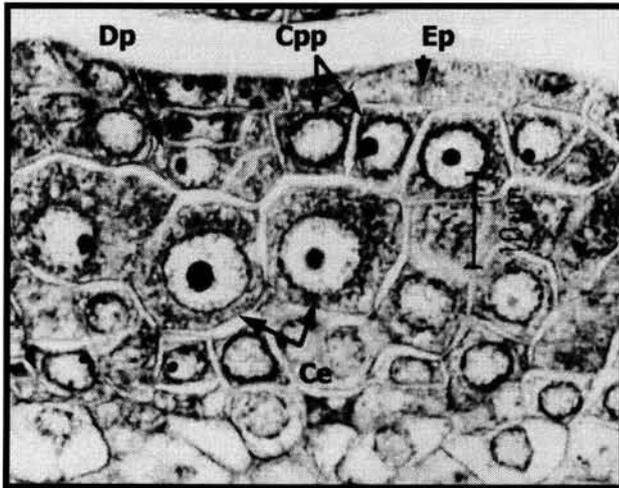


Fig. 52. Corte longitudinal de un lóbulos de antera de *M. san-angelensis*. Se observa la epidermis (**Ep**), las células parietales primarias (**Cpp**) y las células esporógenas (**Ce**). Algunas células parietales primarias comienzan a dividirse periclinalmente (**Dp**). Botón de 2.9mm de longitud.(Campo claro- 335X)

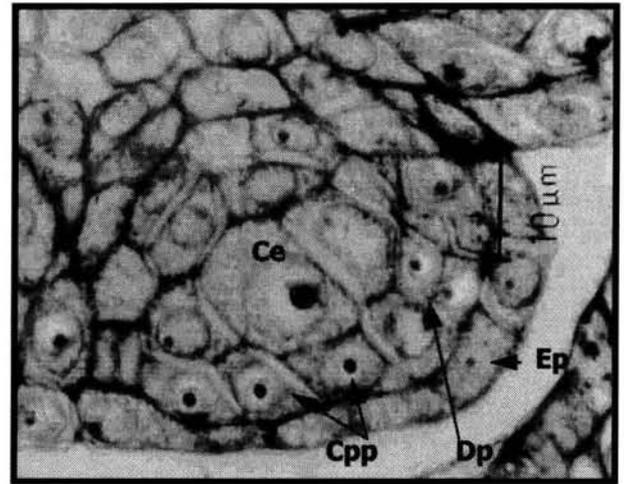


Fig. 53. Corte transversal de microsporangio de *M. haageana*. Se observa la epidermis (**Ep**), las células parietales primarias (**Cpp**) y las células esporógenas (**Ce**). Algunas células parietales primarias comienzan a dividirse periclinalmente (**Dp**). Botón de 2.6mm de longitud. (Campo claro-400X)

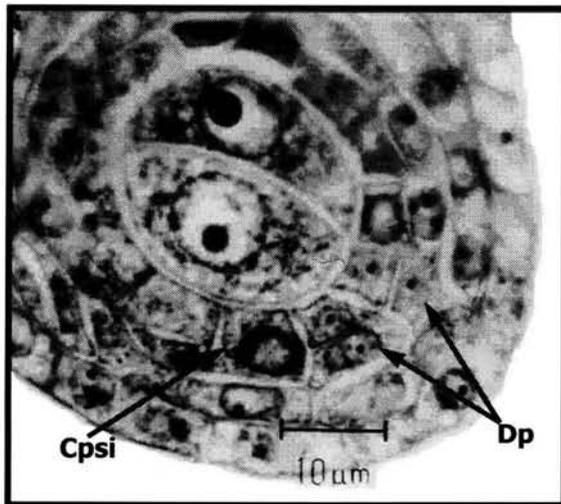


Fig. 54. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. Se observa de la capa parietal secundaria interna (**Cpsi**) comienza a dividirse periclinalmente (**Dp**). (Campo claro-335x)

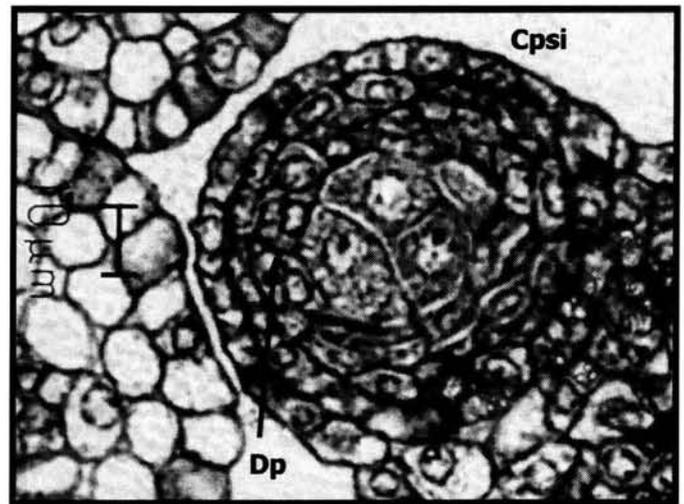


Fig. 55. Corte transversal de microsporangio de *M. haageana*. Se observa que la capa parietal secundaria interna (**Cpsi**) comienza a dividirse periclinalmente (**Dp**). Botón de 2.73mm de longitud. (Campo claro- 200X)

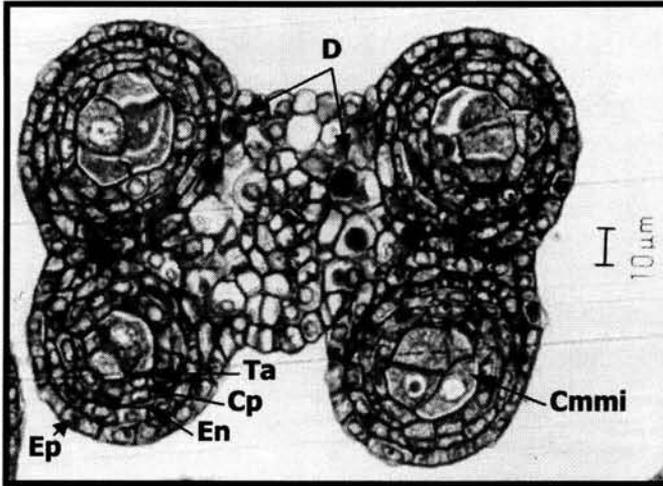


Fig. 56. Corte transversal de antera de *M. san-angelensis*. Se observan 4 capas celulares de la pared de la antera: epidermis (**Ep**), endotecio (**En**), capa media (**Cp**) y tapete (**Ta**). Células madres de las microsporas (**Cm mi**). Drusas (**D**). Botón de 4mm de longitud.(Campo claro-150X)

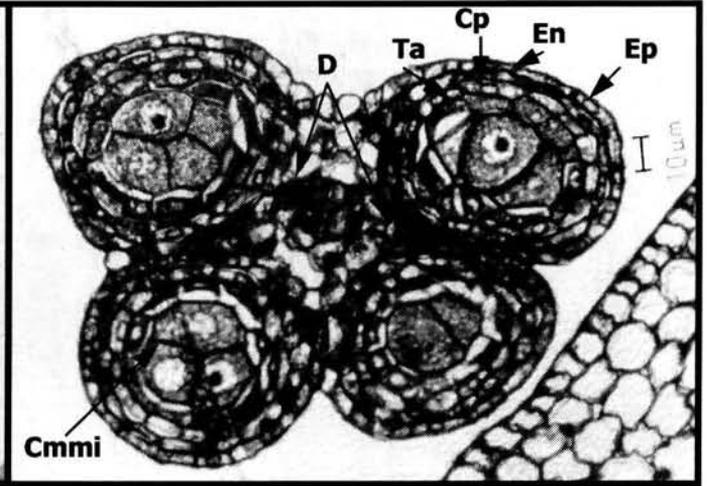


Fig. 57. Corte transversal de antera de *M. haageana*. Se observan 4 capas celulares de la pared de la antera: epidermis (**Ep**), endotecio (**En**), capa media (**Cp**) y tapete (**Ta**). Células madres de las microsporas (**Cm mi**). Drusas (**D**). Botón de 4mm de longitud.(Campo claro-135X)

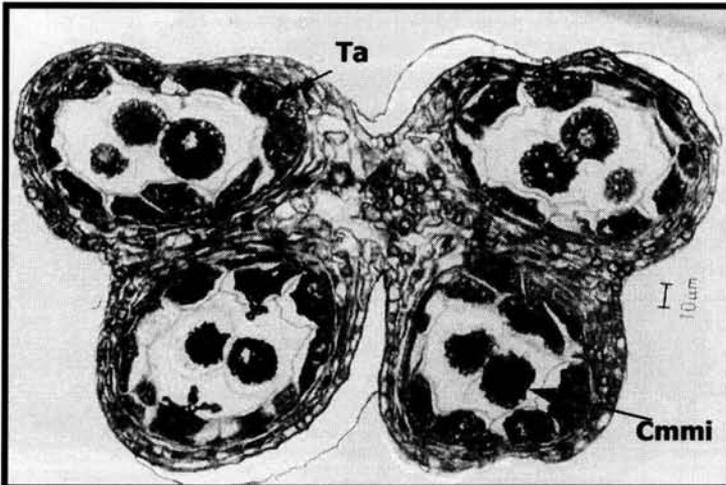


Fig. 58. Corte transversal de antera de *M. san-angelensis*. Las células del tapete (**Ta**) aumentaron de tamaño y secretan sustancias al lóculo de la antera. Células madres de las microsporas (**Cm mi**). Botón de 4.5mm de longitud. (Campo claro 140X)

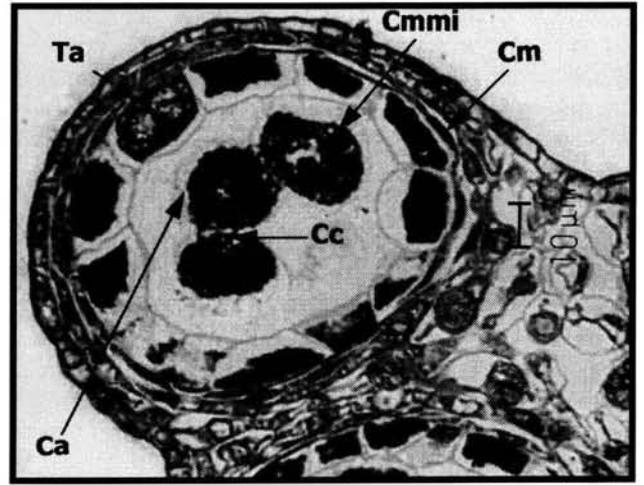


Fig. 59. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. Las células del tapete (**Ta**) son binucleadas, las células madres de las microsporas (**Cm mi**) comienzan a rodearse de calosa (**Ca**) y aún presentan canales citoplásmicos (**Cc**) entre ellas. La capa media (**Cm**) se observa muy constreñida. Botón de 4.6mm de longitud. (Campo claro 200X)

En esta misma etapa las células madres de las microsporas de *M. san-angelensis* presentan núcleos muy conspicuos y citoplasma muy denso. También comienzan a rodearse de una pared de calosa y aún se observa la presencia de canales citoplásmicos entre ellas (Fig. 59).

Posteriormente, comienza la meiosis I de las células madres de las microsporas, pero no ocurre la formación de paredes. Una vez finalizada la meiosis II el resultado es una célula con cuatro núcleos haploides (Figs. 60 y 61). Es entonces cuando comienzan a formarse las tétradas (cúmulo de 4 microsporas) y en *M. san-angelensis* se observó que la citocinesis es simultánea (Figs. 62 y 63).

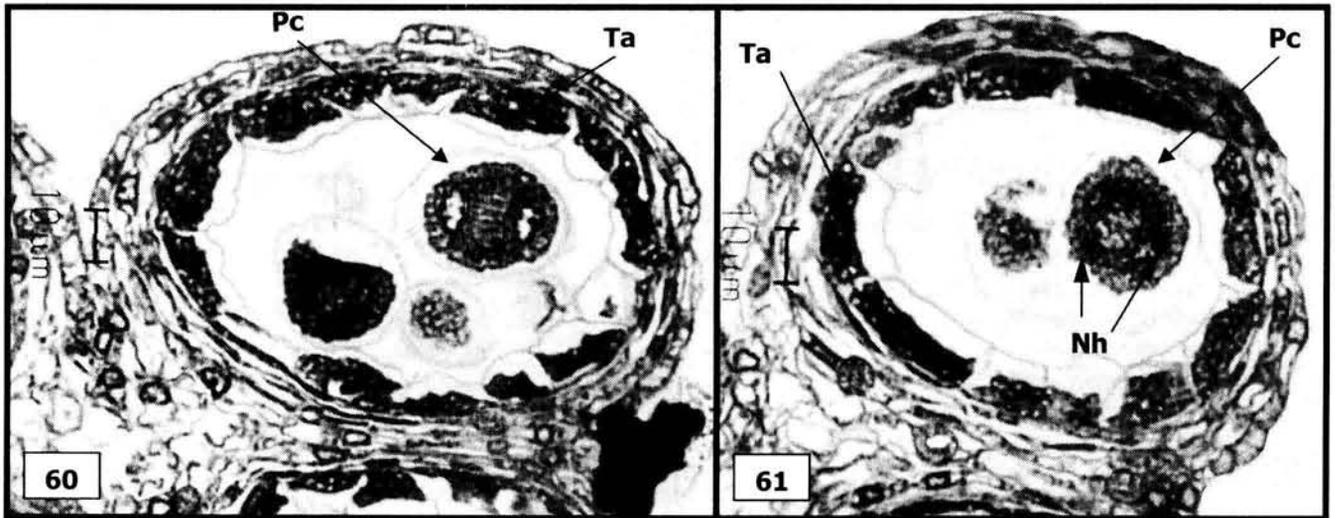
Tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana*, el arreglo que con mayor frecuencia presentan las tétradas es el tetraédrico, pocas veces se presentó el decusado (Figs. 64 a y b; 65 a y b).

En esta etapa la capa media ha degenerado casi por completo en ambas especies (64b y 65 b).

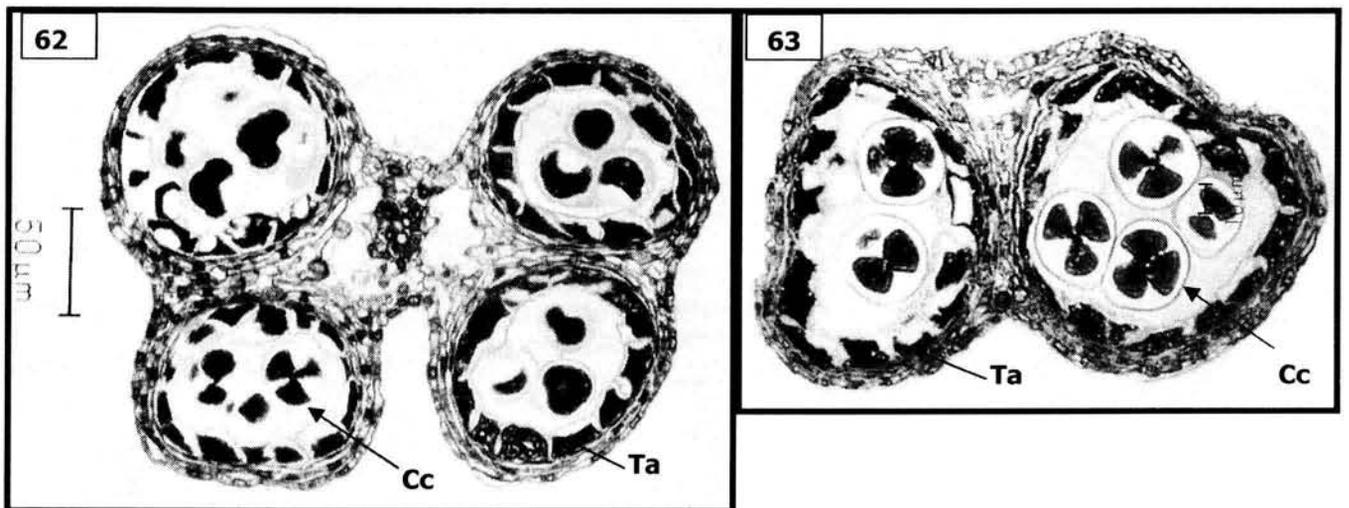
Más tarde las microsporas se separan una de la otra por la degradación de la pared de calosa que compartían. Cada una de ellas se considera un grano de polen joven unicelular. En ambas especies estos granos de polen jóvenes son irregulares y su citoplasma es muy denso. En esta misma etapa es cuando la capa media desaparece por completo, las células epidérmicas y el endotecio se alargan y el tapete aún persiste (Figs. 66 y 67).

En las dos especies, los granos de polen unicelulares aún, aumentan su volumen adquiriendo una forma esférica. En *M. san-angelensis*, es evidente también la presencia de una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma (Fig. 68).

Los granos de polen jóvenes se dividen mitóticamente dando lugar a una célula vegetativa y una generatriz. La célula generatriz en ambas especies se observa en la periferia, cerca de la pared del grano de polen (Figs. 69, 70 a y b). En esta etapa, la célula vegetativa presenta poco citoplasma, la mayor parte del espacio está ocupado por vacuolas de gran tamaño. El tapete comienza a degenerar vertiendo su contenido hacia el lóculo de la antera y por ello se le considera de tipo secretor (Figs. 69, 70 a y b).



Figs. 60 y 61. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. En **60** se observa la meiosis I y en **61** la meiosis II. Estas células con núcleos haploides (**Nh**) presentan alrededor una pared de calosa (**Pc**). Las células del tapete (**Ta**) se observa con citoplasma muy denso. Botón de 4.5mm de longitud. (Campo claro-200X)



Figs. 62 y 63. Corte transversal de de antera y microsporangios de *M. san-angelensis*. Se observa el inicio de la citocinesis simultánea (**Cc**) para formar las tétradas de microsporas, el tapete (**Ta**) aún presenta citoplasma muy denso. Botón de 4.5mm de longitud. (Campo claro- Fig. 62. 85X y Fig 63. 150X)

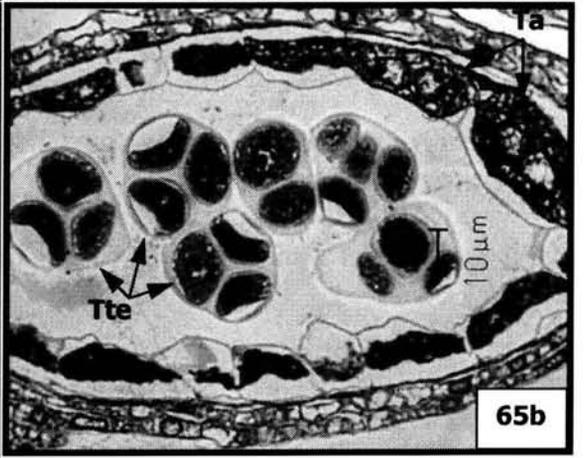
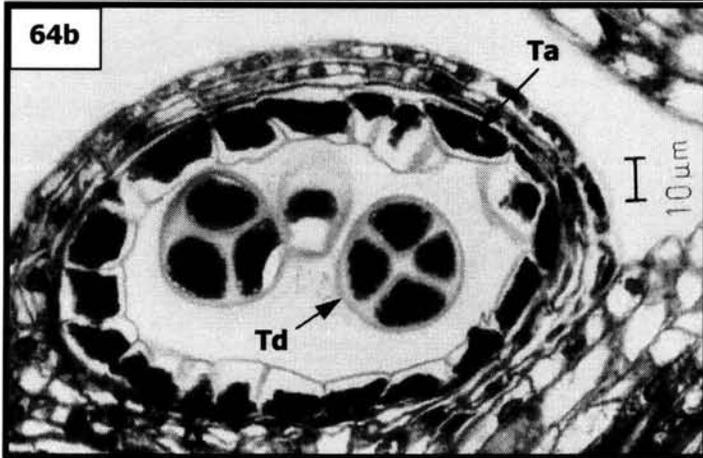
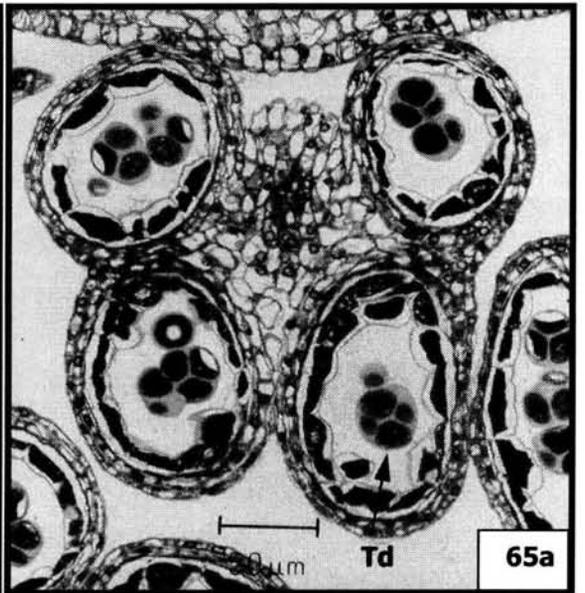
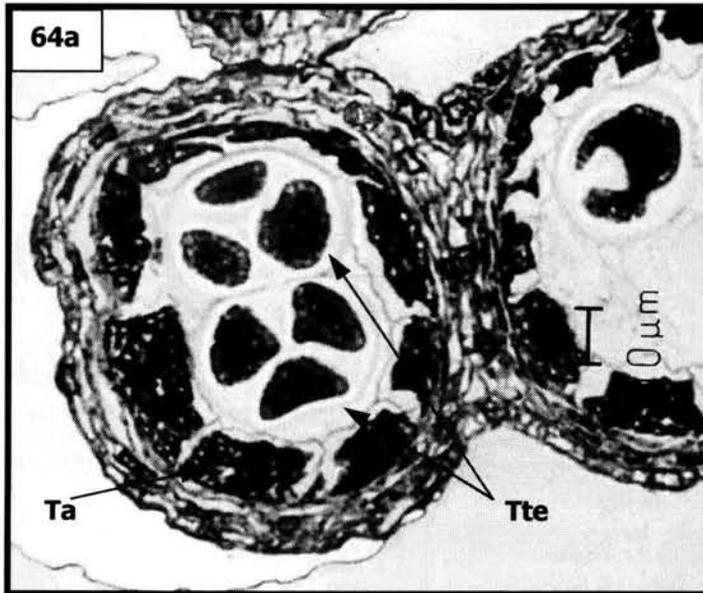


Fig. 64a y 64b. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. Se observan tétradas tetraédricas (**Tte**) y una decusada (**Td**), el tapete (**Ta**) aún persiste. Botón de 4.5mm de longitud. (Campo claro- Fig. 64a. 200X y Fig. 64b. 160X)

Fig. 65a y 65b. y Corte transversal de antera y microsporangio de *M. haageana*. Se observan tétradas tetraédricas (**Tte**) y una decusada (**Td**), el tapete (**Ta**) aún persiste y es binucleado. Botón de 5.5mm de longitud. (Campo claro- Fig. 65a. 75X y Fig. 65b. 200X)

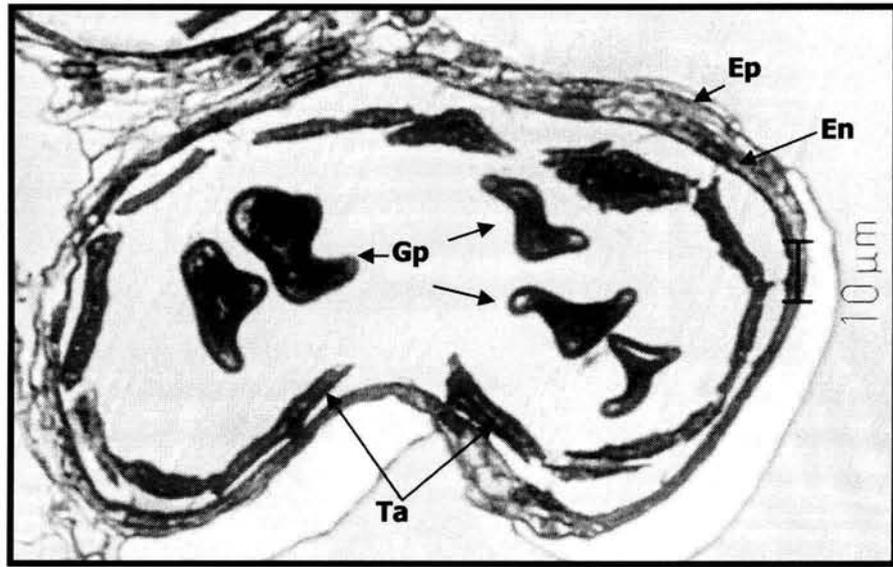


Fig. 66. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. Los granos de polen jóvenes unicelulares (**Gp**) presentan formas irregulares. La epidermis (**Ep**), el endotecio (**En**) y el tapete (**Ta**) aún persisten. Botón de 4.9mm de longitud. (Campo claro 200X)

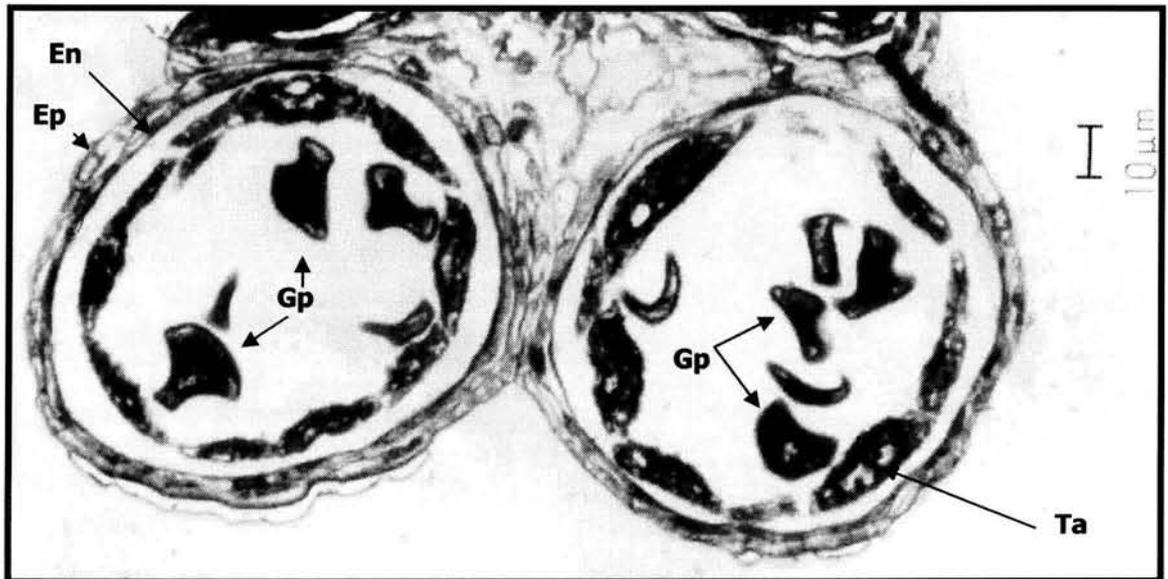


Fig. 67. Corte transversal de microsporangio de *M. haageana*. Los granos de polen jóvenes unicelulares (**Gp**) presentan formas irregulares. la epidermis (**Ep**), el endotecio (**En**) y el tapete (**Ta**) aún persisten. Botón de 6mm de longitud. (Campo claro 125X)

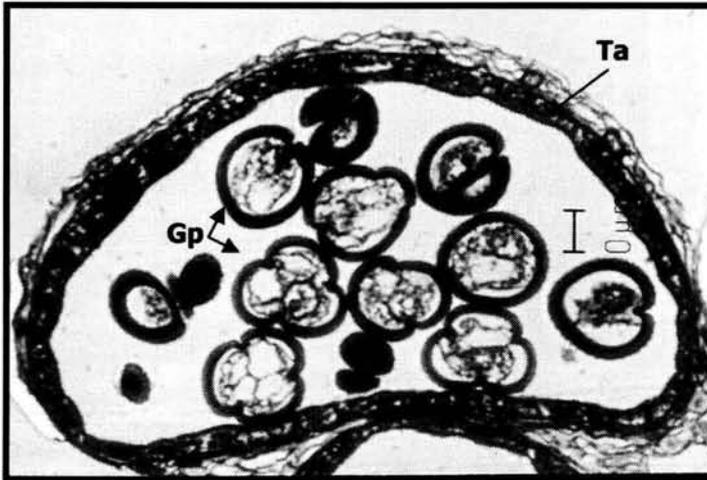


Fig. 68. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. Los granos de polen (Gp) son globosos, unicelulares y su citoplasma presenta muchas vacuolas, el tapete (Ta) aún persiste. Botón de 6.5mm de longitud. (Campo claro- 200X)

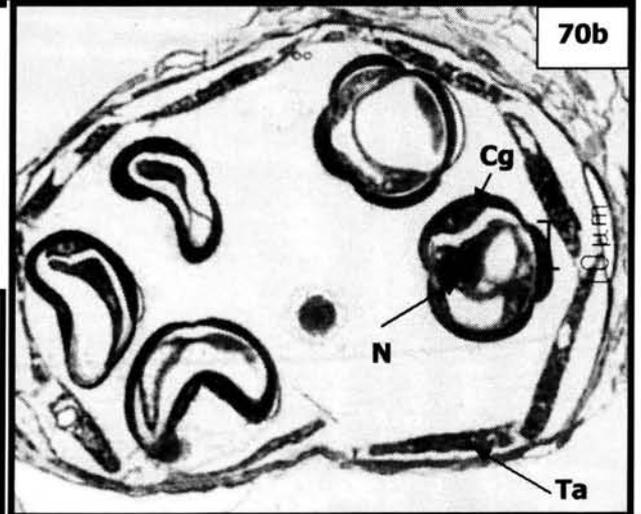
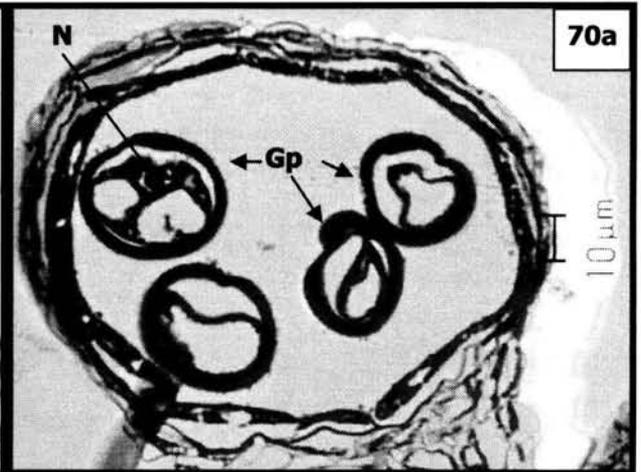


Fig. 70a y 70b. Corte transversal de microsporangio de *M. haageana*. La mayoría de los granos de polen (Gp) son globosos, se observa el núcleo de la célula vegetativa (N) y la célula generatriz (Cg). El tapete (Ta) comienza a degenerar. Botón de 7.1mm de longitud. (Campo claro- 200X)

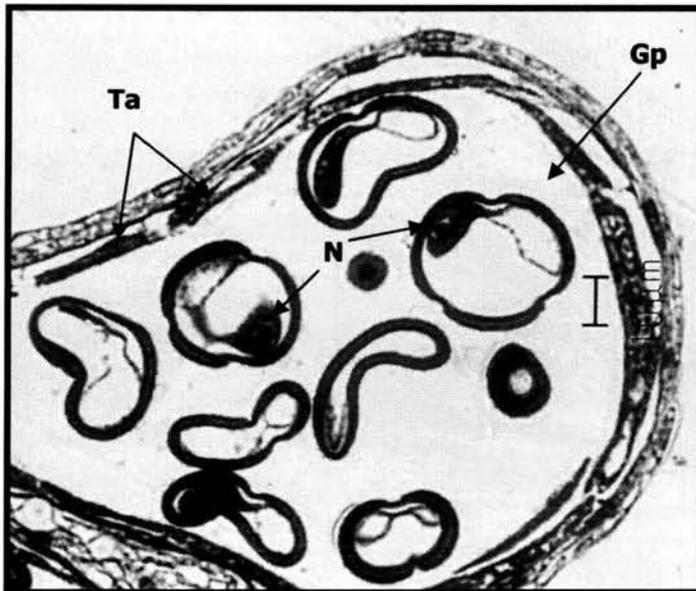


Fig. 69. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. La mayoría de los granos de polen (Gp) son globosos, se observa el núcleo de la célula vegetativa (N). El tapete (Ta) comienza a degenerar. Botón de 7mm de longitud. (Campo claro- 200X)

En una etapa posterior, la célula generatriz ya se observa libre en el citoplasma de la célula vegetativa. En *M. san-angelensis*, se observa la presencia de una gran cantidad de pequeñas vacuolas en el citoplasma de la célula vegetativa. Por el contrario en *M. haageana* el citoplasma de la célula vegetativa se observa denso. En esta misma etapa el tapete ha degenerado casi por completo, así mismo las células del endotecio aumentan su volumen (Figs. 71 y 72).

Finalmente la célula generatriz se divide mitóticamente dando origen a dos células espermáticas.

En ambas especies las anteras se encuentran dehiscentes un poco antes de la anthesis (Figs. 73 y 74) y su dehiscencia es longitudinal. Los granos de polen son liberados en etapa tricelular (Figs. 75 y 76).

En la pared de las anteras maduras sólo persisten dos capas celulares, la epidermis y el endotecio. Este último presenta engrosamientos fibrosos de la pared celular.

Basándonos en la terminología propuesta por Moore y Weeb (1978), el polen maduro tanto de *M. san-angelensis* como de *M. haageana* es tri, tetra y pericarpado, globoso, perforado y micro-equinado. Los granos de polen de *M. san-angelensis* miden de diámetro aproximadamente 45µm y en *M. haageana* 33µm (Figs. 77 a-c, 78 a-c y 79-82).

Morfología externa de la semilla

Basándonos en los parámetros y terminología que proponen Barthlott y Hunt (2000), las semillas de *M. san-angelensis* presentan una coloración café-oscuro y son ovales. El tamaño de las células de la testa disminuye conforme se aproximan a la región hilo-micropilar. Los límites intercelulares de éstas mismas, no se alcanzan a distinguir. Presentan un relieve cóncavo. El micrópilo es disyunto. (Figs. 83, 85 y 87). Las semillas de *M. haageana* presentan una coloración café-rojiza y son ovales. Las células de la testa tienden a ser elongadas y disminuyen su tamaño cuando se aproximan a la región hilo-micropilar. Presentan un relieve cóncavo, se observan ondulaciones en forma de U. El micrópilo es disyunto. (Figs. 84, 86 y 88).

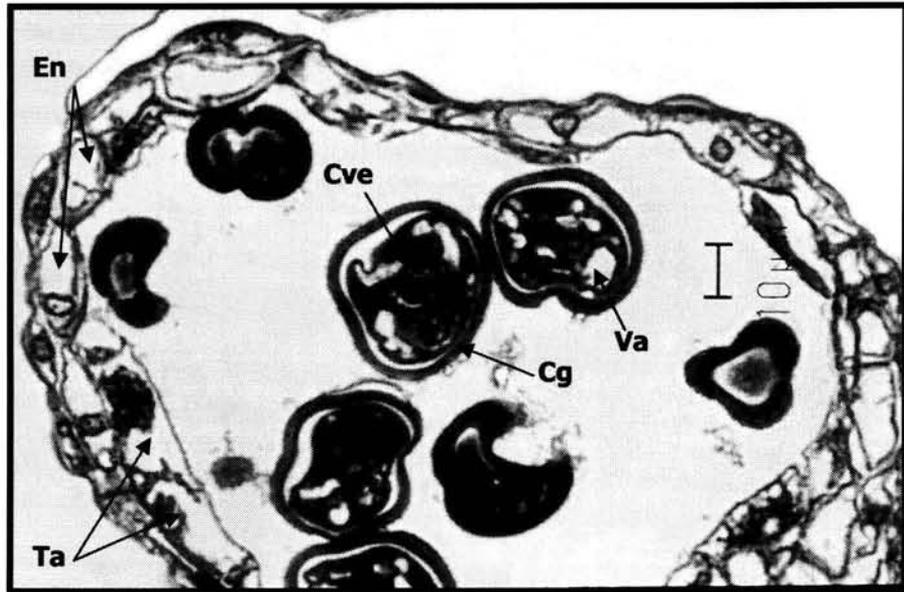


Fig. 71. Corte transversal de microsporangio de *M. san-angelensis*. Se observan vacuolas (**Va**) en el citoplasma de la célula vegetativa (**Cve**), la célula generatriz (**Cg**). El tapete (**Ta**) degeneró casi por completo y las células del endotecio (**En**) aumentaron su tamaño. Botón de 8.3mm de longitud. (Campo claro 200X)

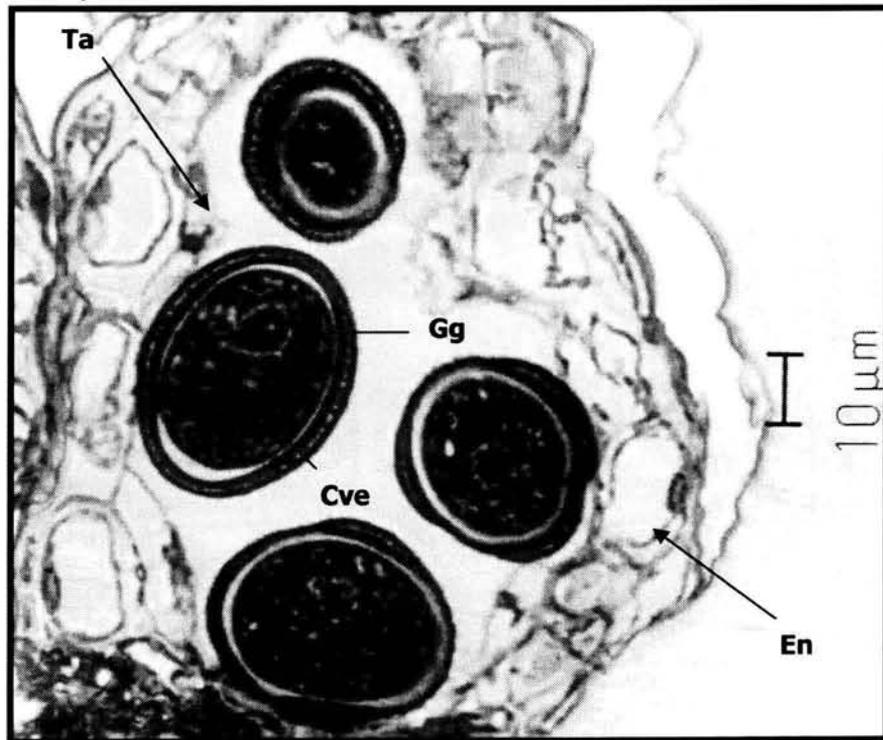


Fig. 72. Corte transversal de microsporangio de *M. haageana*. Se observa la célula vegetativa (**Cve**) y la célula generatriz (**Gg**). El tapete (**Ta**) degeneró casi por completo y las células del endotecio (**En**) aumentaron su tamaño. Botón de 8.7mm de longitud. (Campo claro 200X)

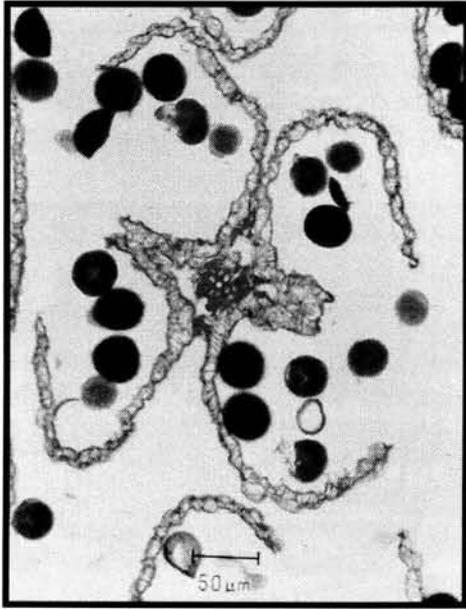


Fig. 73. Conrte transversal de antera dehiscente de *M. san-angelensis* en preantesis. (Campo claro- 54X)

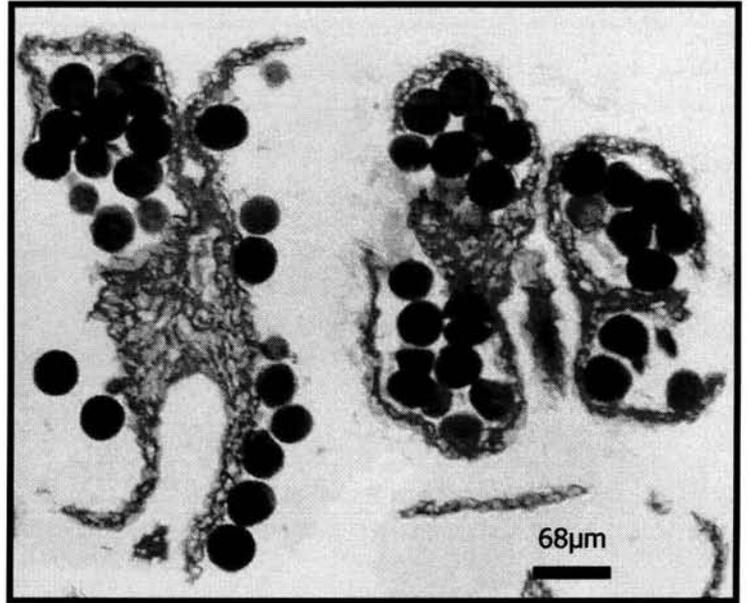


Fig. 74. Conrte transversal de anteras dehiscentes de *M. haageana* en preantesis. (Campo claro- 38X)

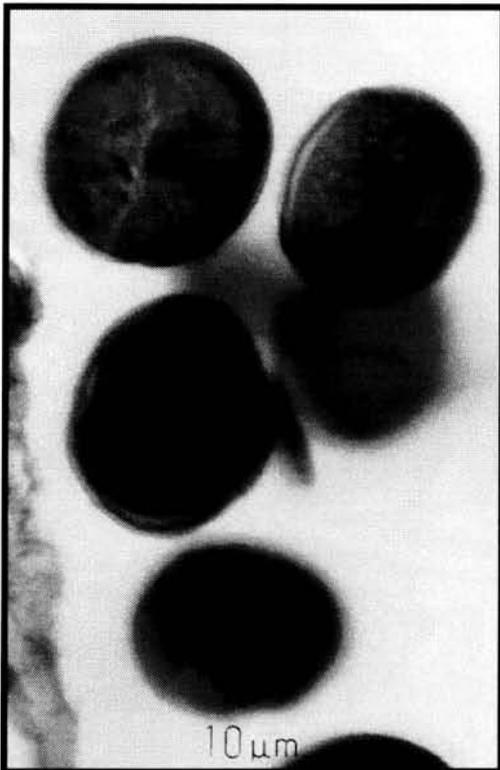


Fig. 75. Grano de polen tricelular de *M. san-angelensis*. (Contraste diferencial de interferencias 200X)

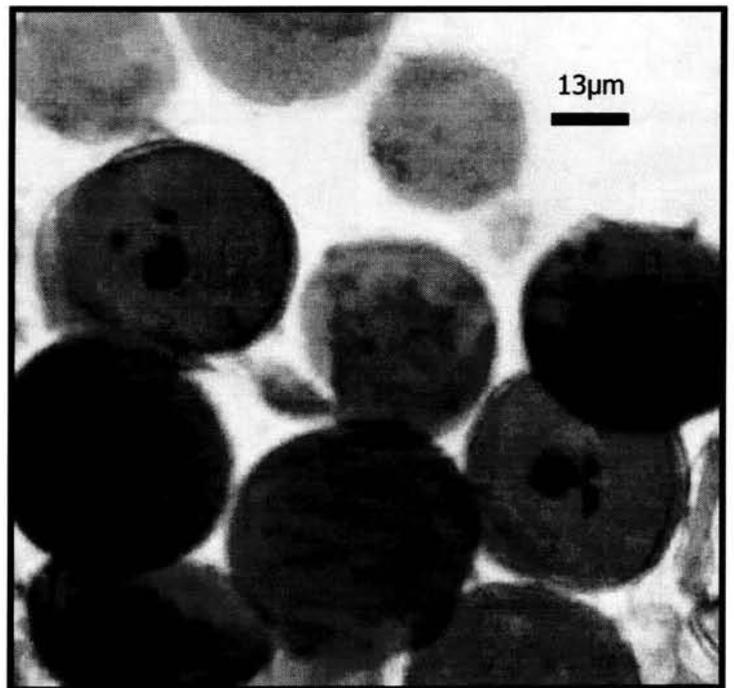


Fig. 76. Granos de polen tricelulares de *M. haageana*. (Campo claro 110X)

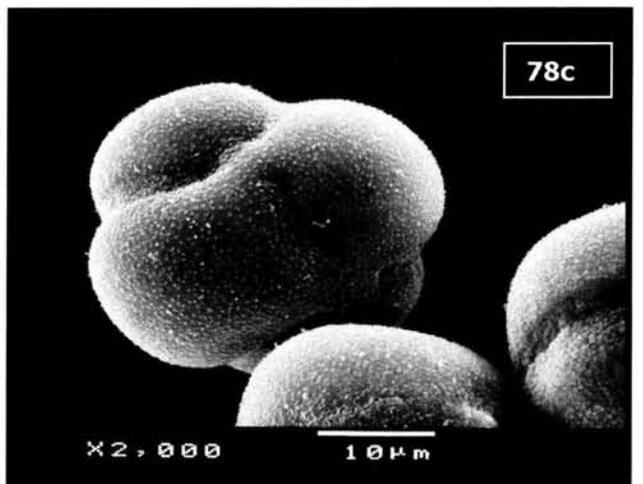
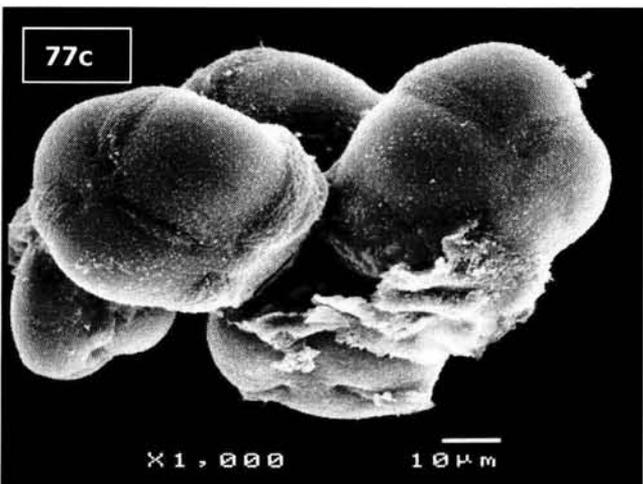
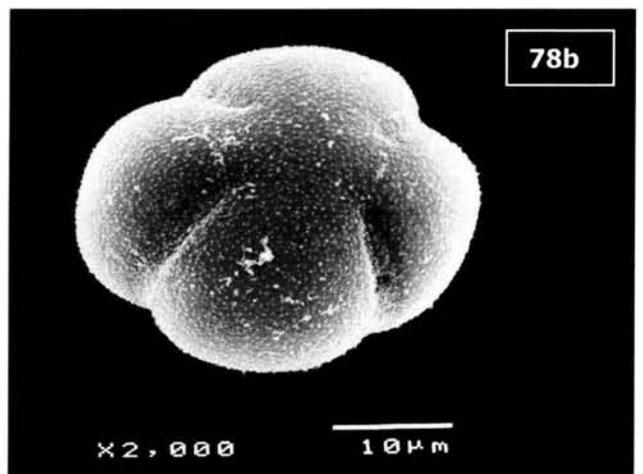
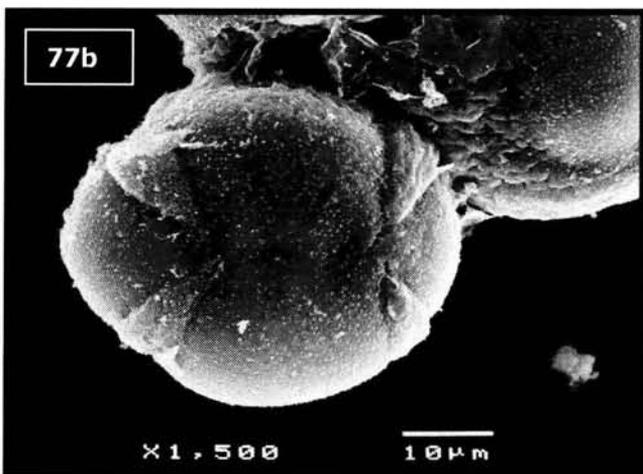
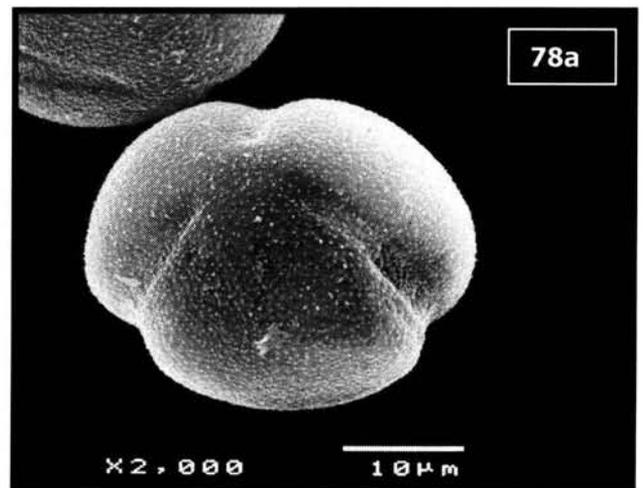
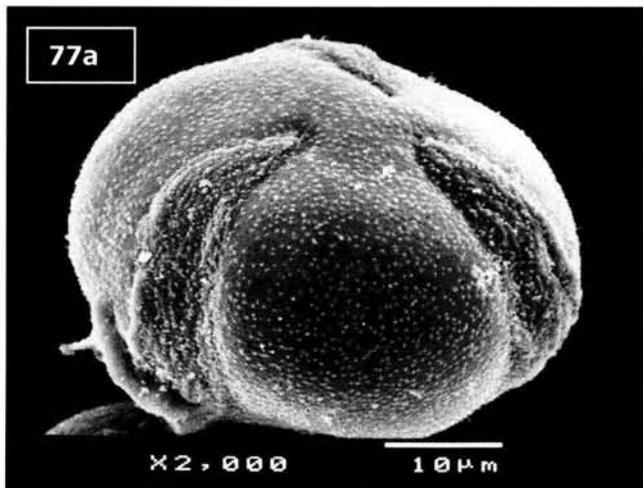


Fig. 77a, 77b y 77c. Grano de polen tricolpado, tetracolpado y pericolpado de *M. san-angelensis*. (MEB)

Fig. 78a, 78b y 78c. Grano de polen tricolpado, tetracolpado y pericolpado de *M. haageana*. (MEB)

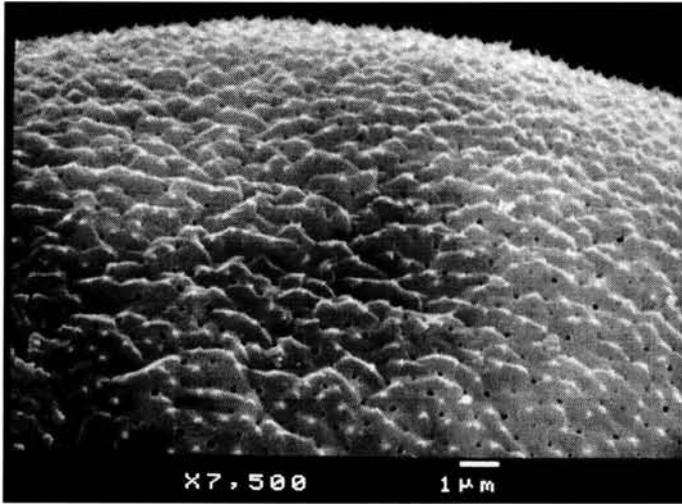


Fig. 79. Acercamiento de la superficie de un grano de polen de *M. san-angelensis*. (MEB)

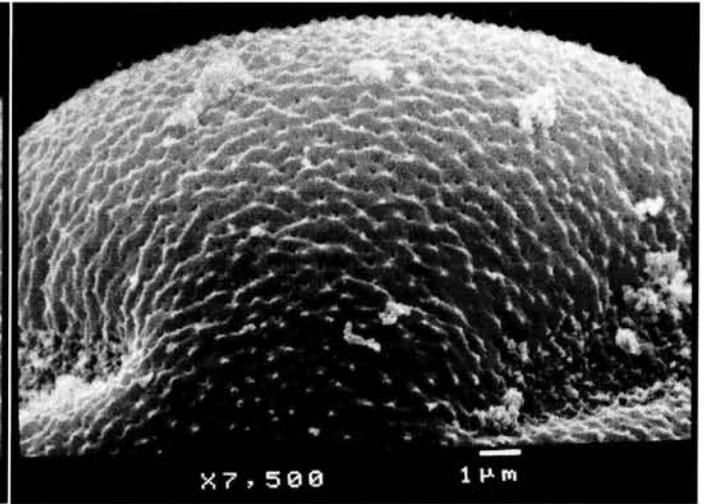


Fig. 80. Acercamiento de la superficie de un grano de polen de *M. haageana*. (MEB)

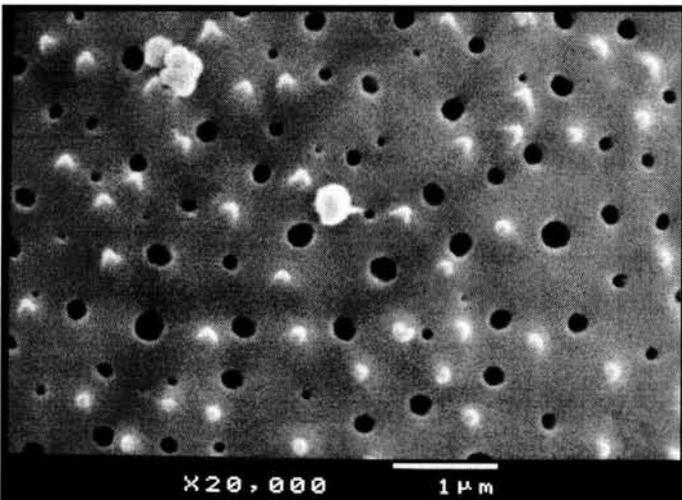


Fig. 81. Ornamentación de la exina de un grano de polen de *M. san-angelensis*. (MEB)

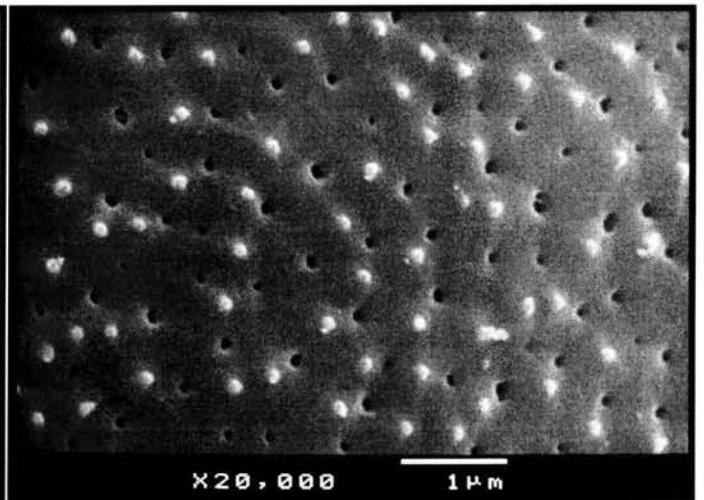


Fig. 82. Ornamentación de la exina de un grano de polen de *M. haageana*. (MEB)

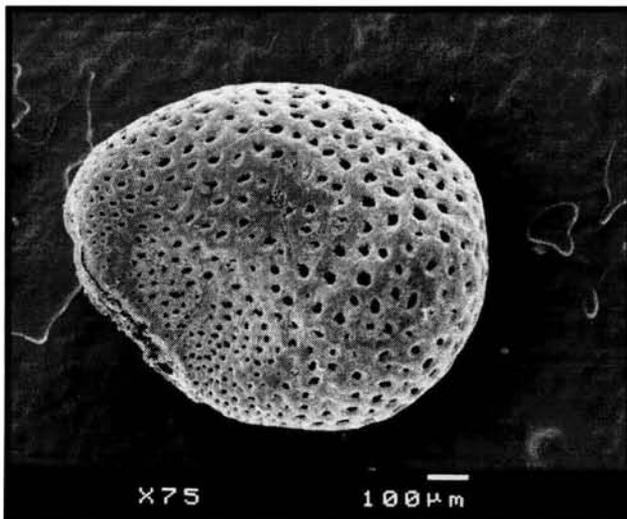


Fig. 83. Vista lateral de semilla de *M. san-angelensis*. (MEB)

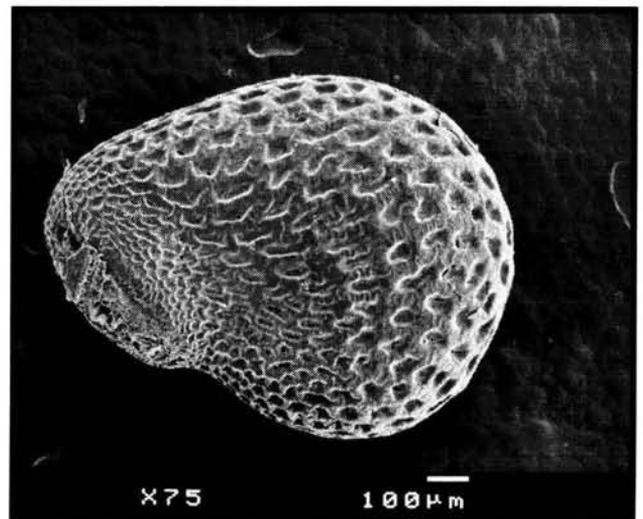


Fig. 84. Vista lateral de semilla de *M. haageana*. (MEB)

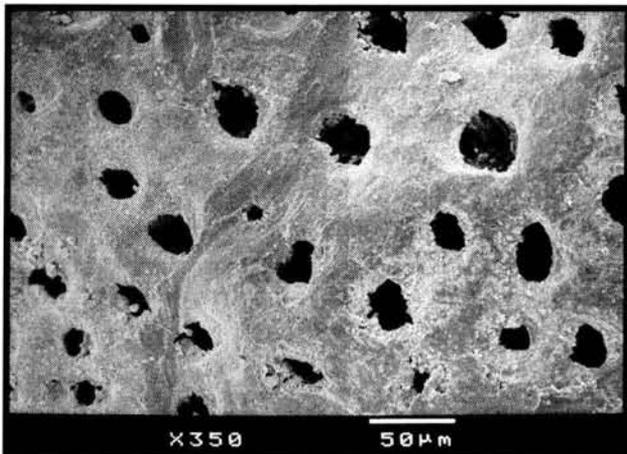


Fig. 85. Ornamentación de la superficie seminal de *M. san-angelensis*. (MEB)

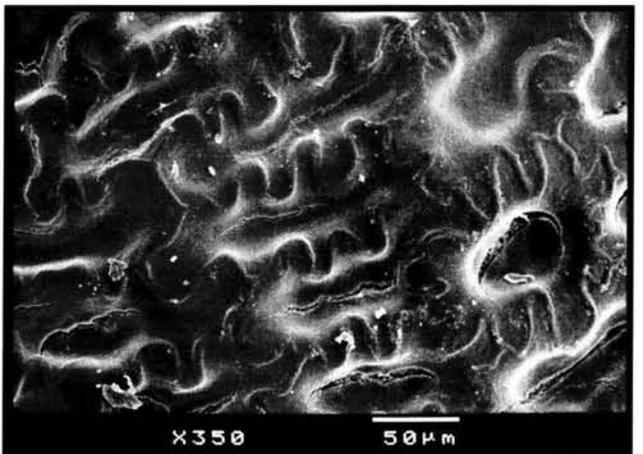


Fig. 86. Ornamentación de la superficie seminal de *M. haageana*. (MEB)

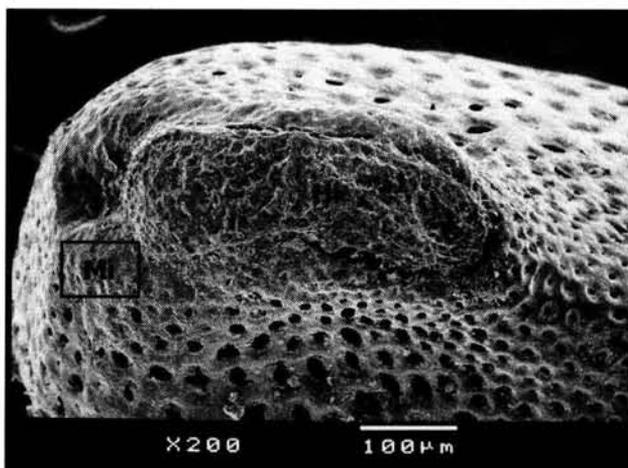


Fig. 87. Región hilo-micropilar de la semilla de *M. san-angelensis*. Hilo (Hi) y micrópilo (Mi) . (MEB)

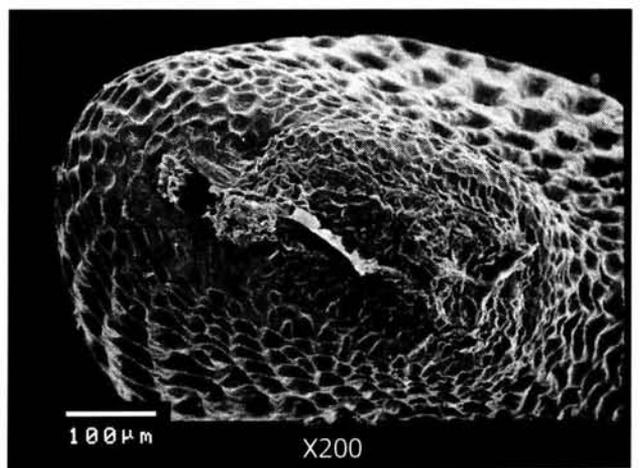


Fig. 88. Región hilo-micropilar de la semilla de *M. haageana*. Hilo (Hi) y micrópilo (Mi) . (MEB)

Viabilidad del polen (Prueba de Alexander)

Tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana*, el 91% de los granos de polen observados resultaron viables y el 9% restante fue anómalo. En la primera especie se logró un conteo total de 415 granos de polen (376 viables y 39 no viables) y en la segunda 488 (443 viables y 45 no viables) (Figs. 89 a y b; 90 a y b)

Los datos específicos del conteo de granos de polen viables y no-viables de ambas especies se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Viabilidad de los granos de polen en *M. san-angelensis* utilizando la prueba de Alexander.

Campo de observación	# Granos de polen VIABLES	# Granos de polen NO VIABLES	TOTAL DE GRANOS POLEN
1	17	0	17
2	24	1	25
3	22	0	22
4	71	0	71
5	61	0	61
6	39	0	39
7	89	1	90
8	9	20	29
9	7	3	10
10	4	9	13
11	12	1	13
12	8	0	8
13	5	1	6
14	8	3	11
TOTAL	376	39	415

Tabla 2. Viabilidad de los granos de polen en *M. haageana*, utilizando la prueba de Alexander.

Campo de observación	# Granos de polen VIABLES	# Granos de polen NO VIABLES	TOTAL DE GRANOS POLEN
1	18	1	19
2	28	0	28
3	37	0	37
4	64	8	72
5	36	1	37
6	44	6	50
7	37	3	40
8	24	5	29
9	18	6	24
10	58	10	68
11	35	3	38
12	25	2	27
13	11	0	11
14	8	0	8
TOTAL	443	45	488

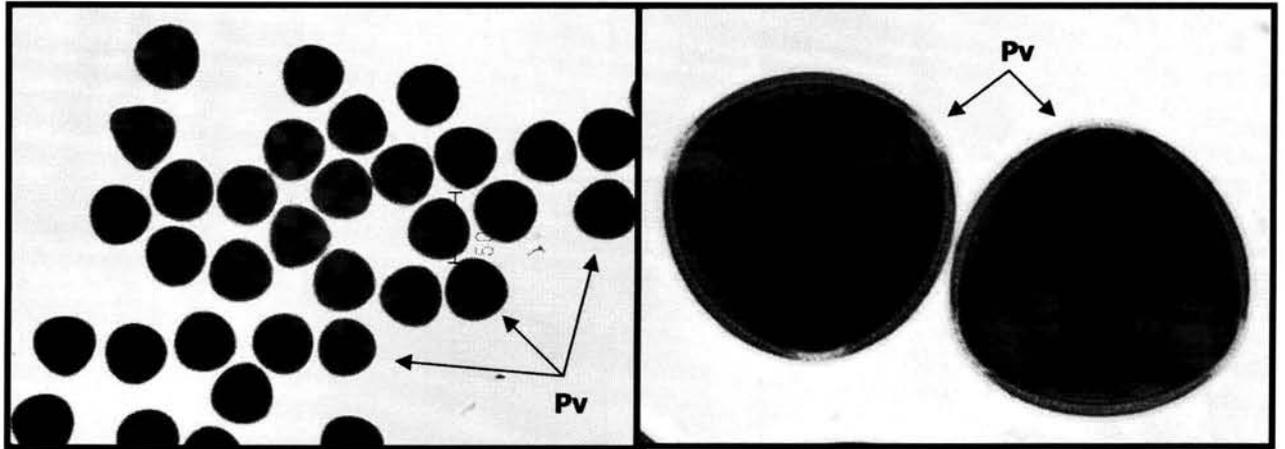


Fig. 89a y 89b. Granos de polen de *M. san-angelensis* expuestos a la tinción de Alexander. Polen viable (Pv). (Campo claro)

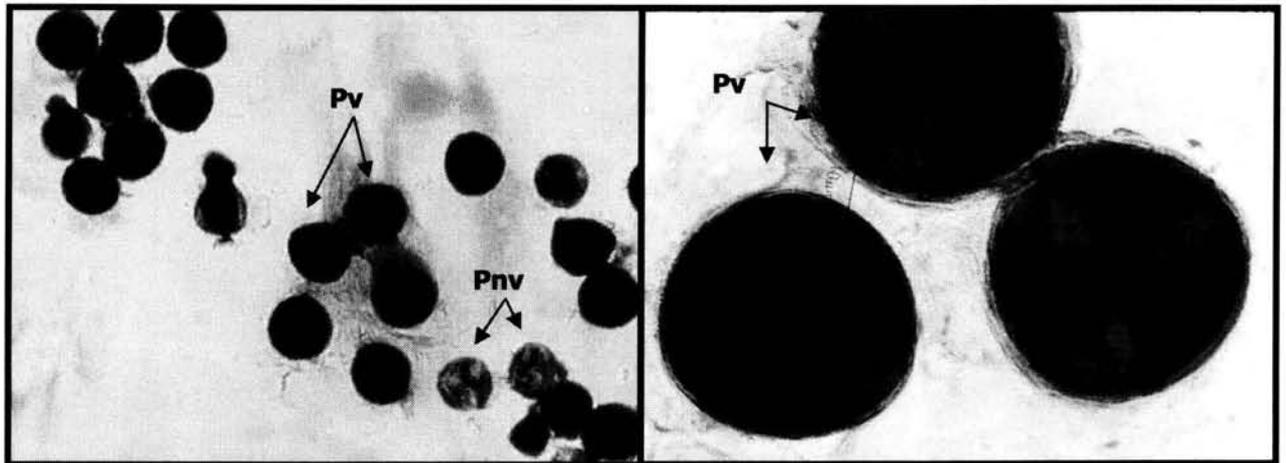


Fig. 90a y 90b. Granos de polen de *M. haageana* expuestos a la tinción de Alexander. Polen viable (Pv), polen no viable (Pnv). (Campo claro)

DISCUSIÓN

Las plantas de *Mammillaria san-angelensis*, producto del cultivo de tejidos *in vitro*, desde hace cinco años han florecido normalmente pero no se ha observado la producción de frutos y semillas. Anteriormente hubo reportes de fructificación y formación de semillas por estas mismas plantas (Rubluo *et al.*, 1993; Chávez y Rubluo, 1995).

Este comportamiento anormal sugiere que el cultivo *in vitro* posiblemente las ha afectado de alguna forma, puesto que se ha comprobado que los procesos *in vitro* pueden producir variaciones en las plantas. En el caso de *M. san-angelensis* podrían ser variaciones somaclonales, pues las plantas proceden de tejido somático. Estas variaciones pueden detectarse por medio de estudios citológicos (Palomino *et al.*, 1999). Sin embargo, los análisis citológicos realizados a los individuos *in vitro* de *M. san-angelensis* mostraron que a pesar del cultivo a largo plazo y la presencia de auxinas en el medio nutritivo, no hubo cambios cariológicos significativos, fueron estables el tamaño del genoma, la ploidia y la endopoliploidización (Palomino *et al.*, 1999).

Otra posible explicación a ese comportamiento, es el desarrollo anormal de las estructuras reproductoras de *M. san-angelensis*, por lo que al analizarlo y compararlo con el de *M. haageana* en la presente tesis, se obtuvo lo siguiente.

FLOR

Las flores, tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana*, surgen de las aréolas ubicadas en la base de los podarios tal como lo reporta Boke (1953) para el género *Mammillaria*.

Se considera que las flores del género *Mammillaria* son simples (Bravo-Hollis, 1978), lo cual coincide con lo observado en *M. san-angelensis* y *M. haageana* cuyas flores presentan tépalos, adroceo y gineceo. Su simetría es radial como en la mayoría de las flores de las cactáceas.

El tamaño de las flores de ambas especies (10-12mm) entra en el rango reportado por Barthlott y Hunt (1993) para la familia Cactaceae (6mm-40cm). Estos mismos autores afirman que los colores más comunes en las flores diurnas son los rojos y amarillos. Las dos especies estudiadas presentaron flores rojas, sin embargo difieren en su tono.

La forma de las flores de *M. san-angelensis* y *M. haageana* es campanulada, la cual se presenta en la mayoría de las cactáceas según Barthlott y Hunt (1993) y Bravo-Hollis (1978).

En general el pericarpelo de las flores de las cactáceas puede estar cubierto por escamas y aréolas, sin embargo en géneros como *Ariocarpus* y *Mammillaria* el pericarpelo es desnudo (Anderson, 2001; Bravo-Hollis, 1978). Coincidiendo con esto, *M. san-angelensis* y *M. haageana* presentan el pericarpelo desnudo.

Gineceo

M. san-angelensis y *M. haageana* tienen un ovario ínfero y unilocular como en la mayoría de las cactáceas, excepto en la subfamilia Pereskioideae donde se reporta súpero (Boke, 1963; Bravo-Hollis 1978; Barthlott y Hunt, 1993). En *M. san-angelensis* se observaron 3, 4 ó 6 carpelos, y en *M. haageana* 2, 3 ó 4. Sin embargo Barthlott y Hunt (1993) reportan que todos los miembros de la familia Cactaceae tienen 4 o más carpelos, aunque en el género *Pereskia* se reportan 5 como mínimo.

Tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana* el número de carpelos coincide con el número de lóbulos estigmáticos y haces vasculares presentes en el estilo. Estas características las reporta Buxbaum (1953) para la familia Cactaceae.

En cuanto al estigma, en ambas especies, los lóbulos estigmáticos están cubiertos completamente por papilas excepto en una franja en la parte abaxial de cada lóbulo, esta misma distribución de papilas la reporta Buxbaum (1953) en *Rhipsalis*.

En las especies estudiadas los estilos son parcialmente sólidos. En el extremo más cercano al estigma presentan un canal que paulatinamente disminuye de tamaño y al llegar a la parte media se observa completamente sólido y así continúa hasta llegar al ovario. En la literatura revisada no se reporta cómo es el estilo.

Megasporogénesis y megagametogénesis

En *M. san-angelensis* y *M. haageana* los primordios de óvulo surgen de la capa interna del ovario presentando una placentación parietal. Este tipo de placentación la reportan Barthlott y Hunt (1993) para la mayoría de las cactáceas aunque en *Pereskia* se considera basal-laminar.

Se observó que en ambas especies los tegumentos surgen de la epidermis nucelar, por lo que se consideran de tipo dérmico, esto se ha reportado en pocas especies entre ellas, *Astrophytum myriostigma* (Engleman, 1960) *Pachycereus militaris* (Nuñez *et al.*, 2001) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002).

En las cactáceas se reporta la presencia de tétradas y tríadas de megasporas ya sea lineales o con forma de T, la megaspora funcional es la calazal (Tiagi, 1970; Johri *et al.*, 1992). En *M. san-angelensis* se observó una tríada lineal de megasporas y la calazal es la funcional, esto apoya lo observado en *Astrophytum myriostigma*, *Thelocactus bicolor*, *Toumeyia papyracantha* (Engleman, 1960), *Mammillaria rhodantha*, *Mammillaria compressa* (Hernández y García, 1991) *Pachycereus militaris* (Nuñez *et al.*, 2001) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002).

Proponemos que el saco embrionario en *M. san-angelensis* y *M. haageana* es de tipo Polygonum al igual que en las demás cactáceas y la mayoría de las angiospermas (Tiagi, 1970; Johri *et al.*, 1992; Bhojwani y Bhatnagar, 2000).

En las cactáceas, las antípodas se caracterizan por ser células efímeras (Johri *et al.*, 1992), lo cual coincide con *M. san-angelensis* y *M. haageana* donde no se lograron observar, por lo que en flores preantéticas el saco embrionario

consta sólo de 4 células y 5 núcleos (2 sinérgidas, 1 ovocélula y 1 célula central binucleada), estas observaciones difieren con lo reportado para *M. rhodantha* y *M. compressa* donde las antípodas desaparecen hasta que ocurre la fecundación (Hernández y García, 1991). En *Pachycereus militaris* también se reportan efímeras (Núñez, *et al.*, 2001).

En cuanto a las sinérgidas, en *M. san-angelensis* tienen forma triangular y en *M. haageana* tienden a ser romboides, en ambos casos presentan una gran vacuola hacia el extremo calazal y el núcleo se localiza hacia el micrópilo, además en la anthesis presentan un evidente aparato filiforme. Las características de las sinérgidas varía de una especie a otra, por ejemplo, se reporta que tienen forma ganchuda en *Opuntia dillenii*, *Mammillaria tenuis*, (Tiagi, 1957; Maheshwari y Chopra, 1995 citados por Tiagi, 1970) *Pachycereus militaris*, (Núñez *et al.*, 2001) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002); éstas dos últimas también presentan aparato filiforme. Sin embargo en *Pereskia lychnidiflora* a diferencia de *Pachycereus militaris*, *Mammillaria san-angelensis* y *Mammillaria haageana*, la vacuola se presenta en la región micropilar y el núcleo hacia la región calazal.

Con respecto a la ovocélula, en *M. san-angelensis* y *M. haageana*, ésta se localiza justo por arriba de las sinérgidas, es decir, hacia el extremo calazal y se observa perfectamente bien constituida, lo cual coincide con lo reportado en *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002). No se reporta ninguna característica de la ovocélula para la familia Cactaceae en general.

En los óvulos de *M. san-angelensis* y *M. haageana* se observó la presencia de un espacio entre los tegumentos y también entre el tegumento interno y la nucela, estos espacios comienzan a hacerse evidentes desde el inicio de la formación del saco embrionario, y cuando el óvulo es completamente maduro y posiblemente fecundado, dichos espacios disminuyen su tamaño. El espacio intertegumentario se reporta como frecuente en la familia Cactaceae (Tiagi, 1970; Corner, 1976; Johri *et al.*, 1992), puntualmente se ha reportado en *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Thelocactus bicolor* (Engelman, 1960) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002). Sin embargo el espacio entre el

tegumento externo y la nucela sólo se reportó en *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002).

Los óvulos de *M. san-angelensis* y *M. haageana* son bitégmicos, el tegumento interno se pluriestratifica en la región micropilar dando origen al micrópilo y por eso se consideran endóstomos. Estas mismas características se han reportado en *Astrophytum myriostigma*, *Thelocactus bicolor*, *Toumeyia papyracantha* (Engleman, 1960), *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Mammillaria rhodantha*, *Mammillaria compressa* (Hernández y García, 1991) y *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002). En *Pereskia lychnidiflora* los óvulos son endóstomos, pero los tegumentos son triestratificados (Jiménez, 2002).

Para las cactáceas se reportan varios tipos de óvulos, entre ellos, anátropos, hemianátropos, campilótropos y circinótropos (Johri *et al.*, 1992). En el género *Mammillaria* se reporta el tipo de óvulo hemicircinótropo (Tiagi, 1970). Sin embargo por la curvatura que presentan los óvulos y por la cercanía del micrópilo con el funículo, los óvulos de *M. san-angelensis* y *M. haageana* son campilótropos, lo cual coincide con lo reportado para *Mammillaria rhodantha* y *Mammillaria compressa* (Hernández y García, 1991).

En cuanto al funículo, Corner (1976) reporta que en las cactáceas usualmente es curvo y rodea más o menos al óvulo y puede presentar pelos funiculares aunque Tiagi (1976) reporta a éstos últimos como células papilosas glandulares, las cuales forman un obturador. Los funículos de las cactáceas en general pueden ser simples o ramificados (Buxbaum, 1953). En *M. san-angelensis* y *M. haageana* el funículo es simple y relativamente corto, por lo cual sólo alcanza a rodear una cuarta parte del óvulo, además presenta obturador, esto coincide con lo descrito para *Mammillaria compressa* y *Mammillaria rhodantha* (Hernández y García, 1991), la única diferencia es que para estas especies se reporta un funículo largo, por lo cual habría que establecer criterios para determinar el tamaño ya que nosotros establecimos el tamaño considerando que en las opuntias por ejemplo, el funículo puede rodear varias veces al óvulo.

Androceo

El número promedio de estambres en *M. san-angelensis* y *M. haageana* fue prácticamente el mismo: 76 y 75 respectivamente. El número de estambres en las cactáceas es muy variable, Barthlott y Hunt (1993) reportan que pueden presentarse de 20 a 4000. Considerando estos datos, *M. san-angelensis* y *M. haageana* entran en el rango y son de las especies que menos estambres presentan. Las anteras de las cactáceas se reportan de tipo bilobulado-tetraesporangiado, lo cual coincide con lo observado en *M. san-angelensis* y *M. haageana*.

Microsporogénesis y microgametogénesis

Tal como Davis (1966) y Tiagi (1970) lo reportaron para la familia Cactaceae, en *M. san-angelensis* y *M. haageana* la pared de la antera comprende 4 capas celulares: epidermis, endotecio, una capa media y el tapete.

Davis (1966) menciona que en la familia Cactaceae, el tipo de desarrollo de la pared de la antera es de tipo monocotiledóneo. Éste se ha reportado en *Pachycereus militaris* (Nuñez *et al.*, 2001), *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002), *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002) y ahora también en *Mammillaria san-angelensis* y *Mammillaria haageana*.

El tapete en *M. san-angelensis* y *M. haageana* es secretor y binucleado, Tiagi (1970) menciona que en las cactáceas éste puede ser bi o multinucleado.

En las anteras maduras de *M. san-angelensis* y *M. haageana* sólo persisten 2 capas celulares: la epidermis y el endotecio, el cual presenta engrosamientos fibrosos, coincidiendo con lo descrito por Davis (1966), Tiagi (1970), Bhojwani y Bhatnagar (2000) para la familia Cactaceae.

El conectivo de las anteras de *M. san-angelensis* y *M. haageana* presenta drusas al igual que en *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002) y *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002).

Las anteras de *M. san-angelensis* y *M. haageana* son dehiscentes antes de la anthesis, esta característica también se reporta en *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001).

Johri y colaboradores (1992), reportan que en la familia Cactaceae se presentan tétradas tetraédricas y decusadas, lo cual coincide con *M. san-angelensis* y *M. haageana* pues se observaron ambos tipos de tétradas, aunque las decusadas se presentaron muy pocas veces. Sin embargo en *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001), *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002) y *Opuntia stenopetala* (Orozco, 2002) se reportan únicamente tétradas tetraédricas.

En ambas especies el tapete vierte su contenido hacia el lóculo de la antera y persiste hasta la etapa en que los granos de polen son binucleados, y por ello se considera de tipo secretor. En *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001) y *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002) también se reporta secretor, sin embargo el tapete comienza a degenerar cuando el polen es uninucleado. En ocasiones el tapete de *Pereskia lychnidiflora* persiste hasta la etapa binucleada del polen.

Los granos de polen de *M. san-angelensis* y *M. haageana* se liberan en etapa tricelular coincidiendo con los reportes de Davis (1966) y Johri *et al.* (1992) para las cactáceas en general.

Los granos de polen maduros en *M. san-angelensis* y *M. haageana*, son tri-tetra y pentacolpados. En ambas especies son globosos, perforados y microequinados. Todas estas características son reconocidas en la familia Cactaceae (Barthlott y Hunt, 1993). Sin embargo el tamaño del polen varía un poco, en *M. san-angelensis* mide 45 μm de diámetro y en *M. haageana* 33 μm aproximadamente.

Morfología externa de la semilla

En la familia Cactaceae la morfología de la semilla, el tamaño, la estructura y el color de la testa, la conformación del hilo y micrópilo muestran una gran

diversidad (Bravo-Hollis, 1978; Barthlott y Voit, 1979 citado en Barthlott y Hunt, 1993; Barthlott y Hunt, 2000). Los términos utilizados por cada autor para describir la morfología de las semillas varían ampliamente lo cual dificulta su comparación. La terminología empleada para describir las semillas de *M. san-angelensis* y *M. haageana* se basa en la propuesta por Barthlott y Hunt (2000).

Las semillas de *M. san-angelensis* son de color café-oscuro y las de *M. haageana* café-rojizo, estos colores se reportan comunes para el género *Mammillaria* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Sin embargo esto no concuerda con lo reportado en las descripciones de ambas especies donde se reporta que la semilla de *M. san-angelensis* es color café-amarillento y en *M. haageana* castaño-oliváceo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

En general las semillas de *M. san-angelensis* y *M. haageana* son ovales, sin embargo en *M. san-angelensis* tienden a ser un poco más redondeadas, aunque en el género *Mammillaria* sólo se reporta que las semillas son piriformes ó globosas (Bravo-Hollis, 1991), también en *Mammillaria rhodantha* se reportan piriformes pero en *Mammillaria compressa* son ovoides (Hernández y García, 1991). La cubierta seminal es diferente, *M. san-angelensis* presenta un relieve cóncavo y las células tienden a ser isodiamétricas, en *M. haageana* el relieve también es cóncavo, pero sus células son elongadas y presentan ondulaciones en forma de U.

En cuanto a la región hilo-micropilar, tanto en *M. san-angelensis* como en *M. haageana* el hilo se encuentra separado del micrópilo y coincidiendo con *M. rhodantha* y *M. compressa* (Hernández y García, 1991) esta región es elíptica.

Es importante aclarar, que desde el año 2001, hemos tenido acceso a estos ejemplares y observamos que efectivamente las plantas no producían frutos ni semillas, sin embargo en diciembre del 2003 uno de los individuos de *M. san-angelensis* presentó 2 frutos y al revisarlos en el laboratorio nos dimos cuenta que uno de ellos carecía de semillas, el otro presentó 7 de ellas, aparentemente bien formadas. Por esta razón se logró realizar la observación de semillas al MEB.

Viabilidad de polen

Según la prueba de Alexander, el porcentaje de polen viable en ambas especies fue el mismo (91%), lo cual coincide con lo reportes que se han hecho para otras especies del mismo género (Mohanty *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1999 citados en Briones; Briones, 2002).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el que *M. san-angelensis* no forme frutos y por lo tanto tampoco semillas, no está relacionado con el desarrollo de las estructuras reproductoras ya que no se encontró ninguna malformación y al momento de la antesis las estructuras sexuales se observan morfológicamente bien constituidas. Comparando esta especie con *M. haageana* no se encontraron diferencias que puedan explicar la ausencia de frutos y semillas en la especie. Habrá que buscar otra(s) explicación(es) que aclare(n) la ausencia de frutos y semillas en *M. san-angelensis* (propagada *in vitro*).

CONCLUSIONES

1. Las dos especies presentan óvulos campilótros, bitégmicos, endóstomos y crasinucelados. Los funículos presentan obturador.
2. Las semillas en las dos especies resultaron ovales, con relieve cóncavo y micrópilo disyunto.
3. Los estilos en ambas especies se observaron sólidos desde la base hasta la parte media y los estigmas son papilosos.
4. En ambos casos, las anteras son bilobuladas-tetraesporangiadas; el desarrollo de pared es de tipo monocotiledóneo; las tétradas son tetraédricas y pocas veces decusadas; presentan drusas en el conectivo. Las anteras son dehiscentes antes de la antesis.
5. Los granos de polen tanto de *M. san-angelensis* como de *M. haageana* fueron tri, tetra y pericarpados, perforados, microequinados y globosos.
6. El porcentaje de viabilidad de polen en ambas especies fue de 91%.
7. Las diferencias encontradas fueron: el número de carpelos, para *M. san-angelensis* fue 3, 4 ó 6 y para *M. haageana* 2, 3 ó 4. El color de las flores de *M. san-angelensis* es magenta mientras que en *M. haageana* es rosa. En cuanto a las semillas, en *M. san-angelensis* son de color café oscuro y no presentan ornamentaciones, en *M. haageana* son café-rojizas y presentan ornamentaciones onduladas con forma de U.
8. De acuerdo a la comparación realizada, prácticamente no hubo variación alguna en el desarrollo de las estructuras reproductoras de *M. san-angelensis* y *M. haageana*.
9. Los óvulos, las anteras, los granos de polen, los estilos y estigmas de las plantas propagadas *in vitro* de *Mammillaria san-angelensis* se encuentran morfológicamente bien desarrolladas, por lo cual se descarta que la ocurrencia de malformaciones en las estructuras reproductoras sea la causa que provoca la ausencia de producción de frutos y semillas en dicha especie.
10. Adicionalmente, la información obtenida proporciona datos útiles a la embriología de la familia Cactaceae. Además, la descripción de los estilos es una aportación nueva.

REFLEXIÓN FINAL

- El cultivo *in vitro* permite producir plantas a gran escala, libres de patógenos, de forma rápida en espacios reducidos. Con esta técnica se puede cubrir la demanda comercial de cactáceas y así evitar la devastación de las poblaciones silvestres. Esta medida es ideal para implementarla como estrategia preventiva.
- Cuando se intentan rescatar especies en peligro de extinción por medio del cultivo *in vitro*, es importante considerar que las plantas obtenidas al ser introducidas a su hábitat natural, deben ser capaces de reproducirse.
- Esto es solo el inicio de un gran reto, pues con el surgimiento de nuevas líneas de investigación que complementen lo que hasta hoy se sabe de la respuesta de las plantas al **cultivo *in vitro***, es posible que en un futuro no muy lejano, éste pueda ser una buena alternativa para el rescate de especies en **peligro de extinción**. Sin embargo, lo ideal sería prevenir que las especies lleguen a esta categoría.

LITERATURA CONSULTADA

- Alexander, M. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55: 13-18.
- Arias, S. 1993. Cactáceas: Conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. Vol. Esp. (XLIV): 109-115.
- Arias, S. 1997. Distribución general. En: Valle, C. (ed.) *Suculentas mexicanas. Cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CVS.
- Anderson, E. 2001. *The cactus family*. Timber Press. USA.
- Barthlott, W. y D. Hunt. 1993. Cactaceae. En: Kubitzki, J.; J. Rohwer y V. Bittrich (eds.). *The families and genera of vascular plants*. Vol.II. Flowering Plants, Dicotyledons. Springer-Verlag, Berlin.
- Barthlott, W. y D. Hunt. 2000. Seed diversity in the Cactaceae subfamily Cactoideae. *Succulent plant research*. Vol.5. England.
- Bhojwani, S. y S. Bhatnagar. 2000. *The embryology of angiosperms*. Vikas Publising House PVT-LTD. Nueva Delhi.
- Boke, N. 1953. Tubercle development in *Mammillaria heyderi*. *American Journal of Botany* 40: 239-247.
- Boke, N. 1963. Anatomy and development of the flower and fruit of *Pereskia pititache*. *American Journal of Botany* 50: 843-858 pp.
- Boke, N. 1964. The cactus gynoeceum: a new interpretation. *American Journal of Botany* 51(6): 598-610.
- Boke, N. 1980. Developmental morphology and anatomy in Cactaceae. *Bioscience* 30 (9): 605-610.

- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bravo-Hollis, H. y F. Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México. Vol. III. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bravo-Hollis, H. 1997. Introducción. En: Valle, C. (ed.) Suculentas mexicanas. Cactáceas. CONABIO, SEMARNAP, UNAM, CVS. México.
- Briones, M. 2002. Análisis cromosómico y respuesta *in vitro* de tres especies de *Mammillaria* (Serie Supertextae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Buxbaum, F. 1953. Morphology of cacti. Sección II. The flower. Pasadena, Abbey Garden Press. California.
- Chávez, V. y A. Rublo. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. En: Linares, E.; P. Dávila; F. Chiang; R. Bye; T. Elias (eds.) Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.
- Corner, E. 1976. The seeds of dicotyledons. Vol. I. Cambridge University Press.
- Craig, R. 1989. The *Mammillaria* Handbook. Lofthouse Publications. Pasadena, California.
- Davis, G. 1966. Systematic embryology of the Angiosperms. John Wiley and Sons. New York.
- Engelman, M. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. American Journal of Botany 47: 460-467.
- Fay, M. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? Biodiversity and conservation 63: 163-169.

- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture the technology. Part1. 2 edition. Exegetics Limited. England.
- Gibson, S. y P. Nobel. 1986. The cactus primer. Harvard University Press, Cambridge, EUA.
- Guzmán, U.; S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM CONABIO. México
- Hernández, G. y E. García. 1991. Anatomía comparada de óvulos y semillas de dos especies del género *Mammillaria* (Cactaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México 51: 25-38.
- Hernández, H. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Acta Botánica Mexicana 26: 35-52.
- Hunt, D. 1999. CITES. Cactaceae checklist. 2ª edición. Royal Botanic Gardens Kew and International Organization for Succulent Plant Study (IOS). EUA.
- Jiménez, K. 2002. Embriología de *Pereskia lychnidiflora* (De Candolle, 1828) Cactaceae. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Johri, B.; K. Ambegaokar; P. Srivastaya. 1992. Comparative embryology of angiosperms. Vol.I. Springer-Verlag. New York.
- Kuksova, V.; N. Piven y Y. Gleba. 1997. Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 17-27.
- Larkin, P. y W. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theoretical Applied Genetics 60: 197-214.
- Leuenberger, B. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). Memories. New York Botanic Garden. 41: 1-141.

- López, M.; J. Márquez y G. Murguía. 1998. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Martínez-Vazquez, O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis*. Journal of Horticultural Science. 64(1): 99-105.
- Methuen Handbook of Colour. 1978. 3a. edición. Eyre Methuen. Ltd. Denmark y Great Britain.
- Moore, P. y J. Webb. 1978. An illustrated guide to pollen analysis. Hodder and Stoughton. Great Britain.
- Núñez, C.; M. Engleman y J. Márquez. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México. 68: 5-13 pp.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engleman (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Palomino, G.; J. Dolezel; R. Cid; I. Brunner; I. Méndez y A. Rubluo. 1999. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long term in vitro culture. Plant Science 141: 191-200.
- Pérez, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara. Vol. I. Cuba.
- Ross, R. 1982. Initiation of stamens, carpels, and receptacle in the Cactaceae. American Journal of Botany. 69(3): 369-379.
- Rubluo, A.; V. Chávez; A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in-vitro culture. Biological conservation 63: 163-169 pp.

- Rubluo, A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). En Y.P.S. Bajaj (Ed.): Biotechnology in Agriculture and forestry. Vol. 40 High-Tech and Micropropagation VI. 193-205pp. Springer- Verlag Berlin Heiderberg.
- Ruzin, S. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press. New York.
- Sánchez-Mejorada, H. 1981. Un nombre nuevo para una cactácea del Anáhuac. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 26: 6-10.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982. Problemas en el control del comercio de las cactáceas. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 27: 27-33.
- Skirvin, R.; K. Mcphooters y M. Norton. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience 29 (11): 1232-1237.
- Tiagi, Y. 1970. Cactaceae. En: Seshachar B. R. (ed). Proceedings of the Symposium on comparative embriology of angiosperms. Bulletin of the Indian National Science Academy. 41: 30-35.
- Toledo, V. y M. Ordoñez. 1993. The biodiversity scenary of México: A review of the terrestrial hábitts. En: Ramammorthy T.; A. Lot.; R.Bye (eds). Biological Diversity of México. Origins and Distribution. 757-777pp Oxford University Press.
- Yeoman, M. 1986. Plant cell culture technology. Botanical monographs. Vol.23. Blackwell Scientific Publications. Edinburgh.

Anexo 1.

Preparación de la solución colorante Azul de Toluidina al .5%

Azul de toluidina	1 g
Bórax	1 g
Agua destilada	200 ml

- Cada reactivo por separado se diluye aforando a 100 ml con agua destilada, y en agitación continua a una temperatura de 20°C.
- Mezclar los reactivos y agitar con varilla de vidrio por 15 – 20 min.
- Dejar en reposo por 24 h.
- Filtrar, guardar en frascos ámbar y etiquetar (nombre del colorante, nombre de quien lo preparó y fecha).