



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de muerte celular programada durante el desarrollo
de las anteras en flores pistiladas de *Opuntia stenopetala*
Engelmann y *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA ISABEL ALFARO PEREIRA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

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

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Estudio de muerte celular programada durante el desarrollo de las anteras en flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* Engelmann y *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae)".

realizado por **Alfaro Pereira Ana Isabel** con número de cuenta **0-9717022-2** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Margarita Collazo Ortega

Propietario M. en C. Gregorio Orozco Arroyo

Propietario Dra. Sonia Vázquez Santana
Tutora

Suplente M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong

Suplente M. en C. Lluvia Hilda Flores Rentería

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 05 de septiembre de 2008

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Esta tesis se la dedico a mi papá por amarme, cuidarme,
ayudarme, comprenderme, apoyarme y enseñarme.

Siempre voy a recordar tu forma de ver la vida,
tu forma de ayudar a todos, el salir adelante con ánimo
y una sonrisa, el amor hacia nosotros, la dedicación
a todo lo que hacías, tu buen humor y tus bromas.

Te agradezco todo lo que me diste
y lo que hiciste por mi.

Lo que soy es por ti.

Te extraño.

Dedico también esta tesis a mi mamá y a mi hermano,
por todo su esfuerzo para tratar de comprenderme y ayudarme,
por su amor incondicional.

Ustedes son lo más importante.

Los amo

Gracias:

Papá por darme la oportunidad de cumplir un sueño.

Mamá y Pepe por su paciencia y su amor.

Mamá Ana, madrina, José Luis, Jorge y Carlos, por todos esos maravillosos momentos que hemos vivido: juegos, vacaciones, comidas, cumpleaños y demás. Y porque están siempre con nosotros y nos apoyan en todo.

Mónica, Sonia, Fifers, Tía Minerva, Tío Ale y familia, por todo el cariño que nos dan.

A toda mi familia por ser alegre, bromista, unida y cariñosa, los quiero a todos.

Luis Fernando por esos momentos bonitos que pasamos, por tu apoyo y tu cariño que jamás voy a olvidar. En mi corazón siempre vas a estar.

A mis amiguis desde CCH, Fabis y Ceci, ustedes son lo máximo y las quiero un buen.

Chucha y Robert porque están a mi lado y me escuchan justo cuando más lo necesito.

A mis amiguis de la fac. Pau, Mar, Yis, Bombón, César, Ixel, Abi y Miguel por esas prácticas, fiestas, reuniones, comidas, clases y etc. etc. etc. que fueron tan chidas a su lado.

Memo, Bere, Fer, Alma, Benjamín, Ariana, Daniel y Gaby por hacer del taller y el lab algo muy divertido.

Sony por toda tu paciencia para explicarme las cosas y enseñarme, pero sobre todo por preocuparte no solo en lo académico sino en lo personal, muchas gracias.

Goyo, por tooodas tus correcciones, por ayudarme a coleccionar, por ponerme en problemas con tus preguntas y sobre todo por firmarme en domingo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, CCH sur y Facultad de Ciencias, por mi formación.

Esta Tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Sonia Vázquez Santana en el Laboratorio del Desarrollo en Plantas, Facultad de Ciencias, UNAM, dentro del taller “Biología del desarrollo y función de las estructuras reproductoras en cactáceas”. <la tesis fue apoyada por los proyectos PAPIIT IN216105 y PAPIIT IN226808.

Agradezco a las profesoras de Taller: Judith Márquez, Margarita Collazo, Sonia Vázquez, Karina Jiménez, Patricia Olgún y Ana Laura López por toda la ayuda, los comentarios y las sugerencias otorgadas durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mis sinodales: Dra. Margarita Collazo Ortega, M. en C. Gregorio Orozco Arroyo, Dra. Sonia Vázquez Santana, M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong y M. en C. Lluvia Hilda Flores Rentería, por sus correcciones, comentarios y aportaciones a este trabajo.

ÍNDICE

RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
Sistemas de reproducción sexual en angiospermas	4
Sistemas de reproducción sexual en la familia Cactaceae	7
Subfamilia Pereskioideae	7
Subfamilia Opuntioideae	7
Subfamilia Cactoideae	9
Desarrollo del androceo y esterilidad masculina en cactáceas	13
Esterilidad masculina	16
Muerte celular programada (PCD)	17
Liberación del citocromo <i>c</i>	22
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
Área de estudio	28
Especies estudiadas	29
Colecta y procesamiento del material biológico	31
Identificación de la muerte celular programada (PCD)	32
RESULTADOS	35
<i>Opuntia stenopetala</i>	35
<i>Opuntia robusta</i>	40
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	54
LITERATURA CONSULTADA	55
APÉNDICES	61

RESUMEN

Opuntia stenopetala Engelman (Opuntioideae) es una planta que presenta flores unisexuales, característica que sólo se ha asociado a 25 especies localizadas en tres de las cuatro subfamilias de la familia Cactaceae (Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae), la cual contiene cerca de 2000 especies hermafroditas.

Una característica en *O. stenopetala* es que presentan dos tipos de individuos: el femenino (individuos con flores masculinas estériles) y el masculino (individuos con flores femeninas estériles). El desarrollo del androceo y gineceo se inicia de manera muy similar en ambos morfos florales, dando la apariencia de hermafroditismo. Sin embargo, pronto hay diferencias en el desarrollo. En estudios recientes se ha observado que la atrofia de las anteras en flores pistiladas de *O. stenopetala* puede ser producto de muerte celular programada.

Se ha reportado que *Opuntia robusta* J. C. Wendland es una especie que puede formar poblaciones dioicas, hermafroditas o trioicas. En las cuales, las flores unisexuales de los individuos masculinos y femeninos de las poblaciones trioicas y dioicas presentan reminiscencias del sexo opuesto.

Por medio de un estudio embriológico se comparó el desarrollo en anteras abortivas de las flores femeninas de *O. stenopetala* y *O. robusta*. Por otro lado, utilizando técnicas inmunológicas, se pretendió determinar si existe relación entre la muerte celular programada y la liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol, esto durante el desarrollo de las anteras de flores femeninas (estériles masculinas) de *O. stenopetala*.

Para *Opuntia robusta*, se pretendió determinar si existía compactación y fragmentación del DNA, así como liberación del citocromo *c* a través de la membrana mitocondrial, procesos que podrían estar relacionados con la activación de la muerte celular programada durante el desarrollo de las anteras de flores femeninas en una población dioica de esta especie.

INTRODUCCIÓN

Las cactáceas constituyen un grupo de plantas nativas del continente americano. Existen muy pocas evidencias de esta familia en el registro fósil, sin embargo se considera como un grupo natural que ha evolucionado entre los últimos 80 a 60 millones de años, el cual tuvo su origen posiblemente en la zona tropical seca de América del Sur. Esta familia de angiospermas se ha diversificado en un considerable número de especies y formas de vida, las cuales se han establecido en varios ecosistemas, aunque se postula que tal hecho se vio favorecido por la aparición de zonas áridas y semiáridas, adquiriendo nuevas adaptaciones morfológicas, fisiológicas y reproductivas, en donde los procesos de hibridación y poliploidía también han tenido un papel importante en la evolución de la familia (Arias, 1997).

Las plantas de la familia Cactaceae son perennes, cuya vida dura desde más de dos años o por tiempo indefinido (dependiendo de la especie). Son plantas dicotiledóneas y generalmente sus tejidos de almacenamiento están muy desarrollados, lo que les permite conservar agua y nutrientes en tallos y raíces para sobrevivir durante la sequía (Arreola, 1997).

Una estructura característica de las cactáceas es la presencia de aréolas, un tejido meristemático con la capacidad de dar origen a hojas, flores, espinas o tallos. Las aréolas comúnmente tienen dos zonas de crecimiento, en la parte superior se producen flores y en la inferior se producen espinas. En algunos géneros, como *Coriophantha spp.* y *Mammillaria spp.* se da una separación completa y evidente de estas zonas meristemáticas. Generalmente en los cactus se origina una flor por cada aréola, aunque existen algunas especies que producen más de una flor por aréola. Las inflorescencias solamente se observan en algunas especies del género *Pereskia*. Las flores en cactáceas son generalmente hermafroditas, sésiles, con simetría radial y de forma generalmente campanulada. Por otro lado, el ovario en las flores de las cactáceas es ínfero (excepto en algunas especies del género *Pereskia*) y está cubierto por tejido del tallo llamado pericarpelo, el cual puede estar cubierto de escamas o brácteas, tricomas o espinas. Con respecto a los estambres, generalmente presentan muchos insertos en la parte superior interna del pericarpelo (Bravo-Hollis, 1978).

Se reconocen cuatro subfamilias para Cactaceae: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Anderson, 2001). La subfamilia Opuntioideae agrupa a aquellas especies con tallos suculentos de forma cilíndrica o aplanada (cladodios), y que poseen hojas deciduas en los estados tempranos de su desarrollo (Bravo-Hollis, 1978; Guzmán, 1997). Estas plantas pueden ser arborescentes, arbustivas o rastreras (Benson, 1982). La característica más conspicua de la subfamilia es la presencia de glóquidas (ahuates) que aparecen en casi todas las aréolas de los tallos, flores y frutos (Guzmán, 1997). En México está representada por los géneros *Opuntia*, *Pereskiopsis* y *Nopalea*. *Opuntia* es el género más ampliamente distribuido del continente Americano. Las opuntias introducidas a la cuenca del Mediterráneo y en Australia, se han adaptado y propagado ampliamente (Bravo-Hollis, 1978; Benson, 1982).

Para Bravo-Hollis (1978) el género *Opuntia* comprende plantas arborescentes, arbustivas o rastreras. El tronco está bien definido o con ramas desde la base. Las ramas son erectas, extendidas o postradas, los artículos son globosos, claviformes, cilíndricos o aplanados (cladodios), muy carnosos o leñosos. Las aréolas axilares tienen espinas, pelos, glóquidas y algunas veces glándulas. La autora divide a este género en cinco subgéneros: *Cylindropuntia*, *Grusonia*, *Corynopuntia*, *Opuntia* y *Stenopuntia*; *Opuntia robusta* (una de las especies abordada en este estudio) se encuentra dentro del subgénero *Opuntia*, mientras que *Opuntia stenopetala* (la segunda especie bajo estudio) dentro del subgénero *Stenopuntia*.

ANTECEDENTES

Sistemas de reproducción sexual en angiospermas

Las angiospermas en su mayoría son hermafroditas, es decir, las flores contienen ambos órganos sexuales: femenino (gineceo) y masculino (androceo) (Barret, 2002). Sin embargo, el desarrollo floral de algunas especies se ha modificado para promover la polinización cruzada (alogamia), el cual es un mecanismo de reproducción que evita efectos de depresión producidos por autopolinización (autogamia), y además promueve heterocigosis, variabilidad genética e intercambio genético (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993). Entre los mecanismos que promueven la alogamia, se incluyen las modificaciones estructurales en la flor como la dicogamia y la heterostilia, los sistemas de autoincompatibilidad y la esterilidad masculina o femenina cuando las flores son bisexuales (Bawa, 1980; Bawa y Beach, 1981). Además existen muchos factores que afectan el grado de polinización cruzada, incluyendo la separación espacial de los sexos, la densidad de la población, las características del polen, los polinizadores y los factores ambientales (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993).

Alrededor de un 10% de las especies de angiospermas han evolucionado hacia alguno de los sistemas reproductivos que comprenden flores unisexuales (Renner y Ricklefs, 1995). Esta unisexualidad puede manifestarse como monoicismo, donde los órganos masculinos y femeninos se encuentran en flores separadas dentro de una misma planta; o dioicismo, donde las flores pistiladas y las flores estaminadas se encuentran en individuos femeninos o individuos masculinos respectivamente (Ainsworth, 2000). Las tasas más altas de polinización cruzada se encuentran en especies dioicas, en donde la polinización cruzada es obligatoria (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993).

Durante la evolución del dioicismo se han originado a partir de sistemas hermafroditas varios sistemas sexuales que son considerados estados intermedios. Dentro de éstos, podemos encontrar a los sistemas ginodioicos, poblaciones compuestas por plantas femeninas y hermafroditas; a los androdioicos, poblaciones compuestas por plantas masculinas y hermafroditas; a los trioicos o subdioicos, poblaciones compuestas por plantas femeninas, masculinas y hermafroditas en diferentes proporciones; ginomonoicos, plantas con flores femeninas y hermafroditas; andromonoicos, plantas

con flores masculinas y hermafroditas, y trimonoicos, plantas con flores femeninas, masculinas y hermafroditas (Ainsworth, 2000; Fig. 1).

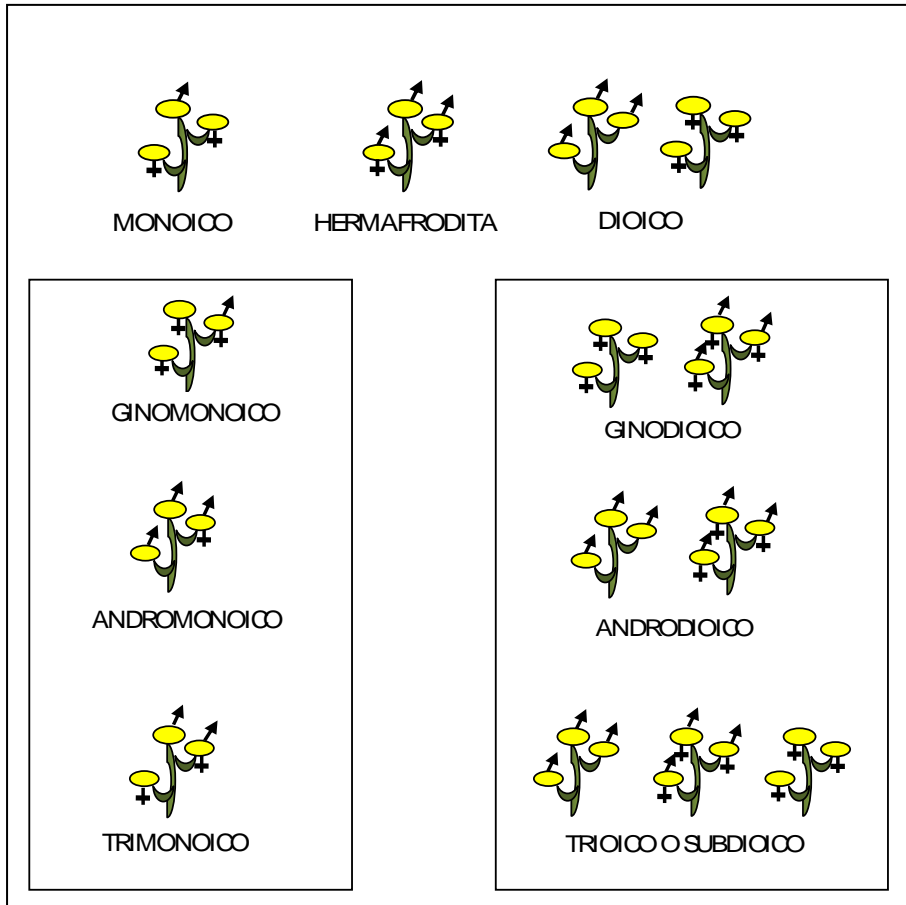


Figura. 1. Sistemas sexuales en plantas. En los recuadros se representan los supuestos estados intermedios entre los sistemas hermafroditas y unisexuales.

Para Mitchell y Diggle (2005) existen dos tipos de morfos florales funcionalmente unisexuales. En el *tipo I*, la iniciación del androceo y del gineceo ocurre en todas las flores y posteriormente el desarrollo de uno de éstos se detiene por *aborción*. En el *tipo II*, el meristemo floral desarrolla solamente uno de los órganos sexuales (gineceo o androceo) y por *supresión* se inhibe uno de ellos, por lo cual la flor nunca pasa por una etapa potencialmente hermafrodita (Fig. 2).

Los estudios embriológicos en la familia Cactaceae son muy importantes pues nos permiten conocer el desarrollo floral de las especies unisexuales dentro de la familia, así como para tratar de entender como pudo haber sido su evolución en diversos sistemas

reproductores, principalmente en los dioicos (Orozco, 2005). Como se mencionó anteriormente, en algunas flores unisexuales podemos encontrar aún los dos órganos sexuales, sin embargo uno de ellos no es funcional, se sugiere que esto se debe a que: 1) no ha pasado suficiente tiempo evolutivo para que se suprima totalmente el desarrollo, 2) porque existe una correlación genética entre el androceo y gineceo con la cual se lleva a cabo la supresión de uno de ellos, o bien 3) porque son importantes para la atracción de polinizadores (Strittmatter *et al.*, 2002; Orozco, 2005).

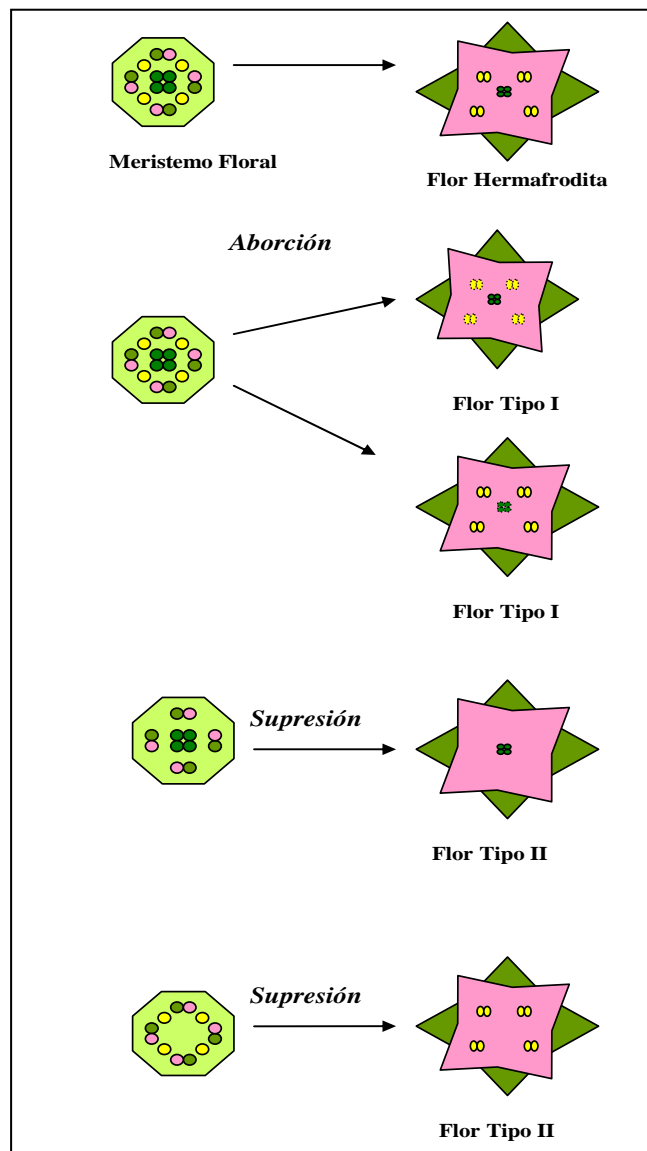


Figura. 2. Posibles vías para la modificación del desarrollo de flores hermafroditas a flores unisexuales. *Aborción*, esterilidad del androceo o gineceo post-iniciación (flor tipo I). *Supresión*, sólo inicia el desarrollo de uno de los órgano o verticilos sexuales (flor tipo II).

Sistemas de reproducción sexual en la familia Cactaceae

El sistema reproductor de la familia es principalmente el hermafrodita, esto es que el gineceo y el androceo se agrupan dentro de una sola estructura floral (Arreola, 1997; Anderson, 2001). Sin embargo algunas veces por aborción del androceo o del gineceo las flores son funcionalmente unisexuales, es decir, aún cuando las flores tienen ambos verticilos sexuales solamente uno se desarrolla de manera normal, con lo cual tenemos individuos con flores pistiladas o femeninas e individuos con flores estaminadas o masculinos (Fig. 2). En la actualidad se han observado 25 especies con un sistema de reproducción sexual diferente al hermafrodita y se encuentran distribuidas en tres de las cuatro subfamilias de Cactaceae: Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Orozco, 2002, Flores, 2005, Sánchez, 2007; Silva, 2007; Hernández, 2008).

Subfamilia Pereskioideae

Dentro de la subfamilia Pereskioideae se encuentra *Pereskia portulacifolia* (L.) DC., que habita en Haití y República Dominicana. Presenta individuos femeninos, masculinos y algunos hermafroditas. Este sistema de cruzamiento podría considerarse como funcionalmente subdioico por el bajo número de individuos bisexuales. Actualmente la embriología de esta especie está siendo estudiada en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM (Camacho *et al.*, 2007).

Otras especies endémicas de República Dominicana son: *P. marcanoi* Areces, con un sistema reproductivo funcionalmente dioico y *P. quisqueyana* Alain, especie funcionalmente androdioica ya que las flores pistiladas no han sido observadas, y no se ha reportado la producción de óvulos y frutos (Leuenberger, 1986). Por último existe *P. zinniflora* DC., especie dioica endémica de Cuba (Areces-Mallea, 1992).

Subfamilia Opuntioideae

Orozco (2002) determinó que *Opuntia stenopetala* tiene un sistema de reproducción funcionalmente dioico. En ese estudio se detectaron tres tipos de flor en los individuos masculinos y uno en los individuos femeninos. Las flores femeninas presentan múltiples lóbulos estigmáticos, sin embargo, las anteras están atrofiadas y son indehiscentes. Por otro lado las flores masculinas presentan variación en la formación de la cámara del ovario. En el primer tipo floral de las flores estaminadas, la cámara del ovario está reducida con respecto a la de las flores pistiladas y los óvulos sólo se

encuentran en la base del ovario; el segundo tipo floral presenta cámara del ovario pero sin formación de óvulos y en el tercer tipo floral la cámara del ovario no se forma. En ninguno de los tres morfos masculinos se presenta un estigma.

Para *Opuntia robusta*, se han reportado poblaciones dioicas, trioicas y hermafroditas (Del Castillo, 1986). La población estudiada por Silva (2007), se describió como funcionalmente dioica, fueron encontrados dos tipos florales. La flor femenina presenta de 10 a 12 lóbulos estigmáticos largos y abiertos, el ovario contiene una gran cantidad de óvulos; sin embargo el androceo degenera un momento después de la meiosis de la célula madre de la microspora, las anteras se ven colapsadas, transparentes e indehiscentes. En la flor masculina el androceo está compuesto por múltiples estambres de color amarillo, son dehiscentes y contienen polen fértil; por otro lado el gineceo presenta lóbulos estigmáticos cerrados, el ovario es reducido y por lo general no presenta óvulos.

Opuntia sanfelipensis Rebman, se encuentra en Baja California, México, y se ha observado que algunas poblaciones presentan individuos con flores hermafroditas e individuos con flores pistiladas que tienen anteras abortivas sin polen, por lo que su sistema de cruzamiento se propone como funcionalmente ginodioico (Rebman, 1998). Otra especie estrechamente relacionada con *Opuntia sanfelipensis* y que comparte muchas características incluyendo el ginodioicismo es *Opuntia wolfei* (L.D. Benson) M. A. Baker, esta especie se distribuye al sur de California y al extremo norte de Sierra Juárez, Baja California (Rebman, 1998).

Consolea rubescens (Salm-Dyck ex DC.) Lem., es una especie endémica de La Hispaniola (Isla formada por Haití y República Dominicana), Puerto Rico y las Antillas. Dentro de las poblaciones de esta especie se han descrito individuos con flores que parecen bisexuales, sin embargo en algunos individuos las anteras no producen polen y en otros no existe producción de frutos. Estudios embriológicos muestran que aún cuando en el comienzo del desarrollo todas las flores son perfectas, las flores que serán masculinas abortan las megasporas en el óvulo y la microsporogénesis cesa en las flores femeninas (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000).

Se menciona que *O. calmalliana* J.M. Coult. y *O. molesta* Brandegee, ambas de Baja California, México, presentan un sistema reproductivo funcionalmente ginodioico,

sin embargo no se describe la morfología floral de estas especies (Rebman y Pinkava, 2001).

Consolea spinosissima Lem., es una planta endémica de Jamaica en la que se ha registrado una población funcionalmente subdioica, la cual está compuesta por tres morfos sexuales. El morfo femenino tiene flores pistiladas las cuales no producen granos de polen ya que el androceo es vestigial. El morfo masculino tiene flores estaminadas con granos de polen viables y un gineceo no funcional, el cual no produce semillas. Por último el morfo hermafrodita tiene flores que superficialmente se parecen a las flores estaminadas pero que a través de un estudio embriológico se ha determinado que el gineceo es parcialmente funcional (Strittmatter *et al.*, 2002).

En *Opuntia quimilo* Schum., se ha observado un sistema de cruzamiento funcionalmente ginodioico ya que se han descrito poblaciones con individuos hermafroditas e individuos femeninos; se distribuye en Argentina (Díaz y Cocucci, 2003).

Subfamilia Cactoideae

Para el caso de la subfamilia Cactoideae, *Selenicereus innesii* Kimnach, es una planta que se distribuye en la Isla San Vicente, presenta un sistema de entrecruzamiento ginodioico pues se reportan individuos con flores hermafroditas e individuos con flores femeninas. Kimnach (1982) menciona que en esta especie las flores femeninas no presentan ningún vestigio del androceo, lo cual la convertiría en la única especie de la familia con esta característica, pero no existen estudios que describan el desarrollo floral.

Hoffman (1992), encontró un sistema de entrecruzamiento funcionalmente dioico en *Echinocereus coccineus* Engelm. En esta especie las flores presentaban una morfología externa aparentemente hermafrodita, pero funcionalmente eran flores masculinas y femeninas. Para el tipo de flor masculino, los estambres estaban bien formados. En el segundo tipo de flor, el femenino, las anteras eran más pequeñas, atrofiadas y sin polen.

Neobuxbaumia mezcalaensis Bravo es una especie endémica del Valle de Tehuacán, México. Esta especie presenta un sistema de entrecruzamiento funcionalmente androdioico, el cual tiene plantas masculinas y plantas hermafroditas. Las plantas con flores masculinas tienen el gineceo completamente reducido sin óvulos maduros y sin producción de frutos (Valiente *et al.*, 1997).

Pachycereus pringlei (S. Watson) Britton y Rose es una especie columnar que se distribuye en el desierto de Sonora, México, presenta varios sistemas de entrecruzamiento relacionado con su distribución geográfica. En un estudio hecho por Fleming *et al.* (1998) se encontraron poblaciones funcionalmente ginodioicas y trioicas, se cree que su sistema de entrecruzamiento tiene una relación directa con la abundancia o escasez de su polinizador. Núñez (2004), llevó a cabo un estudio embriológico de una población funcionalmente trioica, tomando en cuenta tres de los cuatro morfos florales presentes, los cuales fueron: plantas con flores hermafroditas, plantas con flores femeninas y plantas con flores masculinas (los individuos neutros o completamente estériles no se estudiaron); en las flores femeninas encontró anomalías en diferentes etapas del desarrollo de la antera, desde la meiosis hasta la formación del polen. Las anomalías en las flores masculinas se presentan en el ovario, pues generalmente no presentan óvulos y cuando llegan a presentarse éstos son amorfos. La autora reporta la producción de frutos y semillas pero ambos con características irregulares

Echinocereus yavapaiensis M. A. Baker, se encuentra en el condado de Arizona y se ha descrito con un sistema reproductivo funcionalmente dioico. En ambos morfos de esta especie la longitud del estilo y del ovario es igual, sin embargo, la longitud de los estambres en la flor masculina es mayor que los de la flor femenina y en esta última no existe producción de polen fértil (Baker, 2006).

Para *Pachycereus fulviceps* (F. A. C. Weber ex Schum.) D. R. Hunt, distribuida en Oaxaca, México, se han reportado plantas con flores bisexuales y plantas con flores masculinas. En este momento se está llevando a cabo un estudio embriológico para conocer el desarrollo de las flores masculinas (A. González y S. Vázquez, com. pers.).

Mammillaria stebanensis Lindsay, se señala como una planta funcionalmente dioica. En el estudio de Bemis *et al.* (1972) se describe una antera estéril de la flor pistilada, sin embargo no se menciona nada del morfo masculino.

Mammillaria neopalmeri R. T. Craig, se distribuye en Baja California, México y se han encontrado individuos masculinos y femeninos. Los individuos masculinos tienen lóbulos del estigma malformados y raramente producen frutos; los individuos femeninos tienen anteras abortivas. Además del sistema de entrecruzamiento funcionalmente dioico, se ha observado poblaciones hermafroditas y otros sistemas unisexuales (Lindsay y Dawson, 1952).

Mammillaria dioica K. Brandegee, se distribuye en Baja California, México, y tiene un sistema de entrecruzamiento funcionalmente ginodioico. En un estudio embriológico realizado por Sánchez (2007), se describieron dos tipos florales. En la flor bisexual, el androceo tiene anteras dehiscentes con una gran cantidad de polen. En la flor femenina, el androceo se encuentra atrofiado, las anteras no son dehiscentes, están colapsadas y no producen polen, además los filamentos se observan colapsados en la zona de unión con la antera.

En la Tabla 1, se presenta un resumen de los sistemas sexuales diferentes al hermafrodita, encontrados dentro de la familia Cactoideae.

Tabla 1. Especies que presentan sistemas reproductivos sexuales diferentes al hermafrodita en la familia Cactaceae. Tomado y modificado de Orozco (2002), Flores (2005) y Silva (2007).

ESPECIE	SISTEMA SEXUAL	REFERENCIA
SUBFAMILIA PERESKIOIDEAE		
<i>Pereskia zinniflora</i>	Dioico	(Leuenberger, 1986)
<i>Pereskia portulacifolia</i>	Dioico	(Leuenberger, 1896)
<i>Pereskia quisqueyana</i>	Androdioico	(Leuenberger, 1986)
<i>Pereskia marcanoi</i>	Dioico	(Areces-Mallea, 1992)
SUBFAMILIA OPUNTIOIDEAE		
<i>Opuntia grandis</i>	Dioico	(Bravo-Hollis, 1978)
<i>Opuntia glaucescens</i>	Dioico	(Bravo-Hollis, 1978)
<i>Opuntia stenopetala</i>	Dioico	(Bravo-Hollis, 1978)
<i>Opuntia robusta</i>	Hermafrodita, dioico y trioico	(Del Castillo, 1986) y (Silva, 2007)
<i>Opuntia sanfelipensis</i>	Ginodioico	(Rebman, 1998)
<i>Opuntia calmalliana</i>	Ginodioico	(Rebman, 1998)
<i>Opuntia molesta</i>	Ginodioico	(Rebman, 1998)
<i>Opuntia wolfii</i>	Ginodioico	(Rebman, 1998)
<i>Consolea corallicola</i>	Dioico	(Negrón-Ortiz, 1998)
<i>Consolea rubescens</i>	Dioico	(Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000)
<i>Opuntia quitensis</i>	Dioico	(Anderson, 2001)
<i>Consolea spinosissima</i>	Subdioico	(Strittmatter <i>et al.</i> , 2002)
<i>Opuntia quimilo</i>	Ginodioico	(Díaz y Cocucci, 2003)
SUBFAMILIA CACTOIDEAE		
<i>Mammillaria neopalmeri</i>	Ginodioico o trioico	(Lindsay y Dawson, 1952)
<i>Mammillaria dioica</i>	Ginodioico o trioico	(Lindsay y Dawson, 1952) y (Sánchez, 2007)
<i>Selenicereus innesii</i>	Ginodioico o hermafrodita	(Kimmach, 1982)
<i>Echinocereus coccineus</i>	Dioico o hermafrodita	(Hoffman, 1992)
<i>Pachycereus pringlei</i>	Trioico o ginodioico	(Fleming <i>et al.</i> , 1998) y (Nuñez, 2004)
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	Androdioico	(Valiente <i>et al.</i> , 1997)
<i>Echinocereus yavapaiensis</i>	Dioico	(Baker, 2006)
<i>Pachycereus fulviceps</i>	Androdioico o hermafrodita	Arias (com. pers.)

Desarrollo del androceo y esterilidad masculina en cactáceas

Con respecto al desarrollo del androceo fértil, éste comienza con la emergencia del primordio del estambre en el tercer verticilo del meristemo floral y concluye con la liberación de los granos de polen (Sanders *et al.*, 1999). Los primordios de la antera están formados por una protodermis que rodea al tejido arquesporial, el cual se divide mitóticamente en sentido periclinal para dar origen a dos capas: la más interna se diferencia en tejido esporógeno y la externa en la capa parietal primaria, misma que posteriormente va a formar la capa parietal secundaria externa e interna. Posteriormente la capa parietal secundaria externa se convertirá en el endotecio y la capa parietal secundaria interna se dividirá periclinalmente para formar la capa media y el tapete. Cada esporangio tiene cuatro capas, que de afuera hacia adentro son: epidermis, endotecio, capa media y el tapete. En el interior de la antera las células esporógenas se dividen mitóticamente y aumentan de tamaño convirtiéndose en células madres de las microsporas, consecutivamente estas células se preparan para la meiosis depositando calosa alrededor de ellas (Raghavan, 1997). La meiosis da como resultado una tétrada tetraédrica de microsporas rodeada de calosa (Orozco, 2002). Las microsporas son liberadas de la tétrada y subsecuentemente se dividen mitóticamente para producir un gametofito o grano de polen, cada uno con una célula generatriz y una vegetativa, la primera, se divide, para formar así dos células espermáticas (Wu y Cheung, 2000). Por otro lado los filamentos se elongan, la antera se expande y se lleva a cabo la degradación de ciertas células para dar lugar a la dehiscencia de la antera que termina con la antesis (Sanders *et al.*, 1999). La pared de la antera madura está conformada por epidermis y endotecio el cual presenta engrosamientos de celulosa (Orozco, 2002).

Sin embargo, una serie de observaciones han permitido determinar que el estambre puede ser abortado por acciones genéticas en cualquier etapa del desarrollo de este órgano, desde una etapa primordial hasta la etapa de polen maduro. Fenotípicamente estos resultados pueden generar plantas masculinas estériles, las cuales han sido reportadas en un gran número de especies e incluyen mutaciones que se ven reflejadas en la morfología de la antera, la microsporogénesis, el desarrollo de la pared y la viabilidad del polen (Sanders *et al.*, 1999).

Una de las capas de la pared de la antera más importante es el tapete, ya que en ocasiones es esta capa la primera en donde se observan anomalías durante el desarrollo de las que serán anteras estériles. Algunas funciones del tapete son: 1) transporte de nutrientes al lóculo de la antera durante la meiosis, 2) la síntesis de la enzima calasa para la degradación de la calosa que rodea a las tétradas, 3) la síntesis de esporopolenina durante la etapa postmeiótica, 4) transferencia de sustancias pollenkitt y trifina al polen y 5) síntesis de proteínas contenidas en las cavidades y espacios de la exina de la pared del grano de polen, las cuales son útiles en el reconocimiento con pistilos compatibles (Bhojwani y Bhatnagar, 1974).

Algunos ejemplos de defectos en el desarrollo de la antera en cactáceas se han reportado en flores pistiladas de *Consolea spinosissima*, la anomalía de las células del tapete es la primera indicación de la aborción de este órgano. Esta degeneración se da en etapas tempranas del desarrollo, incluso antes de que se lleve a cabo la meiosis en las células madres de las microsporas. Las células del tapete se ensanchan y se vacuolizan antes de que la célula madre de la microspora entre en profase I, en algunos casos las microsporas pueden pasar esta fase y formar una tétrada anormal. En un estado maduro, la pared de la antera está compuesta de epidermis y endotecio, el cual no desarrolla engrosamientos fibrosos. En la anthesis las anteras se encuentran vacías, encogidas y posicionadas por debajo del nivel del estigma (Strittmatter *et al.*, 2002).

Por otro lado en *Opuntia stenopetala*, se ha descrito que los primordios estaminales de las flores pistiladas son semejantes a los de las flores estaminadas en etapas tempranas del desarrollo. La pared de la antera en esta etapa está formada por epidermis, endotecio, capa media y tapete, todas uniestratificadas. La diferencia se da hasta que en las flores pistiladas las células madres de las microsporas se deben rodear de calosa, ya que éstas no entran a meiosis ni forman una tétrada, sino que en su lugar comienzan a colapsarse y posteriormente también lo hacen todas las capas de la pared de la antera, observándose desorganizadas y amorfas (Orozco, 2002; Flores, 2005).

Con respecto a *Pachycereus pringlei*, se ha observado que las flores femeninas son bisexuales en etapas tempranas del desarrollo, la pared de la antera se encuentra formada por el tapete, capa media, endotecio y epidermis y las células madres de las microsporas las cuales tienen una apariencia normal. Sin embargo, las diferencias en el

desarrollo se observaron cuando las células madres de las microsporas en las flores femeninas se empiezan a rodear de calosa, ya que ésta se adhiere en forma irregular, mostrando una pared de calosa sumamente delgada donde se llegan a observar puentes citoplásmicos entre las células madres de las microsporas. En algunas anteras se reportan células con apariencia de microsporas que contienen un citoplasma denso rodeado por exina. Se han reportado inclusive granos de polen jóvenes con formas irregulares y que muchas veces sólo presentan restos de citoplasma por lo que la mayoría no son viables. Con respecto a la pared de la antera en flores femeninas, el tapete se hipertrofia y el citoplasma de sus células invade el lóculo, la capa media desaparece y el endotecio empieza a formar engrosamiento. En preantesis encontramos granos de polen que llegan a formarse pero se observan hipertrofiados, la pared de la antera en esta etapa está constituida por epidermis, endotecio y las paredes celulares del tapete (Núñez, 2004).

En *Mammillaria dioica*, Sánchez (2007) reporta que el desarrollo de las anteras en las flores femeninas se da de manera normal hasta la etapa premeiótica, en este momento la pared de la antera comienza a tener un crecimiento anormal. Se observa el crecimiento del endotecio y la capa media. En el tapete hay un aumento considerable en el volumen, a tal grado que invade el lóculo de la antera. Posteriormente en el desarrollo, el endotecio forma engrosamientos fibrosos en forma de barra, mientras que la capa media degenera completamente. El tapete se divide y se vuelve biestratificado, el estrato interno desarrolla engrosamientos fibrosos semejantes a los del endotecio, mientras que el otro estrato comienza a desaparecer. En el lóculo de la antera la mayoría de las células madre de las microsporas degeneran y muy pocas logran entrar a meiosis. En esta especie la etapa de meiosis más avanzada que se observó fue metafase I. Finalmente las anteras y parte del filamento se colapsan.

En las anteras de las flores pistiladas de *Opuntia robusta*, Silva (2008) observó que la pared en etapas tempranas del desarrollo está formada por cuatro capas uniestratificadas: epidermis, endotecio, capa media y tapete. Más adelante en el desarrollo de la antera, las células del tapete duplican su tamaño y posteriormente se vacuoliza e hipertrofia hasta que degenera durante la meiosis de las células madres de la microspora. Con respecto a la microsporogénesis las células madres de la microspora se rodean de calosa e inician la meiosis, pero la pared de calosa es irregular y no se

desarrolla por completo. En esta especie se llegan a observar díadas, tríadas y tétradas de microsporas. En etapas avanzadas del desarrollo la tétrada de microsporas presenta anomalías y finalmente colapsa y degenera.

Esterilidad masculina

La esterilidad masculina en plantas es definida como una falla en la producción de anteras, polen o gametos masculinos funcionales, ha sido ampliamente documentada en poblaciones naturales en diversas especies de angiospermas y su persistencia y propagación han sido teóricamente demostradas como el primer paso en la evolución al dioicismo, principalmente a partir de poblaciones hermafroditas (Charlesworth y Charlesworth, 1978; Charlesworth y Charlesworth, 1979).

Se conocen dos tipos de esterilidad masculina, a) la esterilidad masculina nuclear, en donde las mutaciones ocurren en genes nucleares y b) la esterilidad masculina citoplásmica, en donde las mutaciones ocurren en genes mitocondriales.

Con respecto a la *esterilidad masculina nuclear* existen diferentes categorías: 1) mutantes que perturban los órganos sexuales masculinos, es decir, mutaciones homeóticas que afectan la identidad de los estambres y los cambian por sépalos o carpelos resultando en individuos estériles masculinos, 2) mutantes en los que hay formación de estambres pero no formación de tejido esporógeno, es decir, no hay formación de granos de polen y las anteras se encuentran malformadas, 3) mutantes en los que el filamento no crece ocasionando problemas de polinización, 4) mutantes en los que no se forma polen debido a que se altera el desarrollo de las microsporas antes, durante o después de la meiosis, 5) mutantes en los que se afecta la dispersión del polen debido a defectos en la dehiscencia de la antera y 6) mutantes en los cuales los genes de control de incompatibilidad esporofítica alteran la interacción con el estigma, aun cuando haya abundancia de granos de polen (Chaundry, 1993).

Por otro lado, la *esterilidad masculina citoplásmica* es un estado heredado maternalmente, el cual se define como la incapacidad de producir o liberar polen funcional sin alterar la fertilidad femenina y se ha demostrado que está asociada con aberraciones en el genoma mitocondrial. Existen tres categorías de esterilidad masculina

citoplásmica, S, C y T, las cuales se distinguen de acuerdo a su patrón de restauración de la fertilidad masculina por medio de genes de restauración. Los citoplasmas tipos S y C requieren un solo gen restaurador, mientras que el citoplasma tipo T necesita dos genes restauradores (Dewey *et al.*, 1987).

La esterilidad masculina citoplásmica (CMS por sus siglas en inglés) se ha observado en 150 especies de angiospermas, y sirve de modelo para entender la interacción entre los factores nucleares y citoplásmicos, así como para entender la función de la mitocondria en el desarrollo normal de la antera y del polen viable. Los sistemas más estudiados se dan principalmente en plantas cultivadas como el maíz, arroz, frijol, girasol, petunia, cebolla y zanahoria (Schnable y Wise, 1998).

Los cambios morfológicos que preceden a la CMS en varias plantas, ocurren en diferentes estados del desarrollo. Uno de los primeros signos visibles en la mayoría de las especies que la presentan es la prematura degradación de la capa del tapete; parece lógico que la degeneración de ésta pueda causar CMS debido a que, como hemos visto anteriormente, esta capa al estar en íntimo contacto con el polen en desarrollo, juega un papel muy importante su desarrollo.

Muerte celular programada (PCD)

La muerte de grupos específicos de células es parte esencial del crecimiento y desarrollo de muchos organismos eucariontes, incluyendo plantas y animales. Además, el papel que desempeña la PCD durante el desarrollo puede ser también un componente de la respuesta a factores bióticos y abióticos que producen estrés (Buchanan *et al.*, 2000). La PCD se define como el proceso resultado de la activación específica de una vía bioquímica, la cual está regulada genéticamente por la célula. Por el contrario la necrosis se refiere a una muerte accidental de la célula, la cual no requiere la activación de alguna señal de transducción (Coimbra *et al.*, 2004). Se piensa que la muerte celular programada emergió desde hace mil o dos mil millones de años con un origen que pudo haberse dado en organismos unicelulares (Ameisen, 2002).

Para Balk *et al.* (1999), la muerte celular programada se puede separar en tres fases: *inducción*, donde la célula recibe la señal que estimula la PCD; *efector*, donde la señal activa al ejecutor central; y *la degradación celular*, donde la célula es desmantelada.

Según Van Doorn y Woltering (2005), existen tres tipos de PCD de acuerdo a sus características morfológicas:

Autofagocitosis. Es un sistema de degradación y reciclaje en las células eucariontes. Se lleva a cabo por vacuolas lisosomales donde se digieren los componentes citoplásmicos. Existen tres subtipos de autofagocitosis, la micro-autofagocitosis, en donde pequeñas porciones del citoplasma se encuentran en las vacuolas lisosomales; la macro-autofagocitosis que ocasiona la formación de una estructura con doble membrana llamada autofagosoma, la cual absorbe parte del citoplasma; el tercer tipo es la autofagocitosis por permeabilización o ruptura del lisosoma o del tonoplasto, esta permeabilización es el resultado de la liberación de hidrolasas vacuolares las cuales degradan lo que exista dentro de la célula. En plantas, la micro-autofagocitosis y la autofagocitosis por permeabilización han sido observadas, mientras la macro-autofagocitosis aún no se establece.

Apoptosis. Hay tres características morfológicas que definen este tipo de PCD (característico de células animales): la fragmentación nuclear, la formación de cuerpos apoptóticos y la degradación de estos cuerpos apoptóticos en el lisosoma de otra célula. La formación y degradación de cuerpos apoptóticos por otras células no se ha encontrado durante la PCD en plantas. Existen otras características para la apoptosis: 1) la condensación de la cromatina, 2) el rol de las proteínas semejantes a caspasas en la señalización y 3) la fragmentación del DNA, características que han sido descritas en plantas.

El tipo de PCD más extendido y observado es la apoptosis, la cual puede ser identificada por diversos factores morfológicos como la contracción celular, la condensación de la cromatina seguida de fragmentación de DNA, formación de cuerpos apoptóticos y la reabsorción de las sustancias por células vecinas, éstos dos últimas características no han sido observadas en plantas (Tabla 2) (Vianello *et al.*, 2007).

PCD no-lisosomal (o parecida a necrosis). Este proceso es el menos estudiado, se caracteriza por una pérdida general de citoplasma sin que se involucre de manera clara un organelo u otra célula en el proceso. Se propone que su mecanismo de acción sea la

inhibición de una vía biosintética, pero, no se ha establecido en que líneas celulares vegetales se lleva a cabo este proceso.

Tabla 2. Comparación entre características morfológicas y bioquímicas de PCD en células de animales y plantas. Tomado y modificado de Vianello *et al.* (2007).

	Animales	Plantas
Contracción celular	+	+
Cuerpos apoptóticos	+	-
Condensación de la cromatina	+	+
Fragmentación nuclear	+	+/-
Aumento mitocondrial	+/-	+/-
Disipación del potencial eléctrico mitocondrial (mDY)	+	+
Alto nivel de ATP	+	+/-
Proteínas pro-apoptóticas	Familia Bcl-2	BAX?
Liberación del citocromo c	+	+/-
Liberación de endonucleasa	+	+
Caspasas	+	Metacaspasas
Enzimas procesadoras vacuolares	-	+
Apoptosomas	+	?

- + Presente
- Ausente
- +/- Presente en ciertas especies

Para Nooden (2004), la PCD en plantas es un proceso controlado por factores endógenos que puede darse a nivel celular (pérdida de megasporas al final de la meiosis de la célula madre de la megaspora), de tejidos (formación de aerénquima, del endospermo), de órganos (senescencia de las hojas, pétalos y frutos) o en todo un individuo (plantas monocárpicas).

En los últimos años se han realizado algunos estudios sobre PCD en diferentes procesos vegetales. El grupo de Quirino *et al.* (2000), propone que la senescencia es una forma de PCD, ya que es un sistema genéticamente controlado que lleva a la autodestrucción celular. A nivel celular el programa de senescencia se lleva a cabo de forma ordenada, los cloroplastos son unos de los primeros organelos en ser afectados, mientras que el núcleo y las mitocondrias (esenciales para proveer energía) permanecen intactos hasta las últimas etapas. Los autores determinan que este proceso puede ser

activado por factores internos (dependientes de la edad de la planta) o bien por factores externos (como hormonas, cambios de temperatura o agentes patógenos).

Muchos genes que han sido identificados como inductores de senescencia en las hojas codifican también proteínas relacionadas a una respuesta de hipersensibilidad (HR por sus siglas en inglés, un mecanismo utilizado para limitar el crecimiento patógeno en un sitio de infección) y aunque ambos procesos tienen diferencias, a nivel molecular es posible que ambas vías de muerte celular compartan ciertos pasos, por lo que esta respuesta a patógenos podría tratarse de PCD (Quirino *et al.*, 2000).

Otro proceso donde se ha identificado PCD es en la formación de traqueidas y elementos de vasos. Para ello, los contenidos celulares de estas células deben degradarse. Dahiya (2003), menciona que estas células tienen un único programa de muerte celular, el cual se activa al final de su diferenciación y que durante este programa los organelos de la célula son cuidadosamente desensamblados, siendo la degradación del DNA nuclear una importante característica de este proceso irreversible. La diferenciación de las traqueidas ha sido muy útil para el estudio de muerte celular, ya que muchos genes y enzimas muestran patrones específicos de expresión para que este proceso se lleve a cabo.

Un tercer ejemplo de PCD es el estudiado por Shishkova y Dubrovsky (2005), quienes observaron que existe en raíces de dos especies de cactáceas, *Stenocereus gummosus* (Engelm. Ex Brandege) A. Gibson y K. E. Horak y *Pachycereus pringlei*. En este estudio se determinó por medio de una prueba de TUNEL que el proceso de muerte celular se ve implicado en la pérdida de la cofia y en la renovación de los pelos radiculares.

Como ya se mencionó, existen algunos cambios citológicos y bioquímicos que se relacionan con el proceso de PCD, entre ellos la condensación nuclear, la agregación de la cromatina en los márgenes nucleares, la contracción celular y la fragmentación del DNA. Este último evento puede ser detectado por la prueba de TUNEL (por sus siglas en inglés, TdT-mediated dUTP nick-end labeling), que es una técnica *in situ* que detecta la condensación y fragmentación del DNA por la incorporación de una fluoresceína en el extremo libre 3'-OH, la cual emite una fluorescencia (Nooden, 2004).

Con respecto a las estructuras florales, se ha visto que la PCD es un proceso muy importante que puede presentarse desde la diferenciación de los órganos sexuales hasta la antesis. En la mayoría de las especies unisexuales, los primordios del androceo y gineceo se forman, pero uno de estos órganos detiene su desarrollo y degeneran. Esta aborción selectiva de uno u otro órgano ocurre por PCD. Tal es el caso de *Actinidia deliciosa*, donde Coimbra *et al.* (2004) reportan que en la etapa de tétrada, en las anteras de las flores masculinas y flores femeninas no se observa una diferencia en el desarrollo, sin embargo una vez que la calosa se disuelve y las microsporas se liberan, comienza un proceso degenerativo en las anteras de los individuos femeninos, se llegan a encontrar estructuras parecidas a polen pero únicamente con la pared de exina. Algunas de las características de PCD observadas en esta especie son: condensación del citoplasma, condensación de la cromatina, y fragmentación del DNA (observada por prueba de TUNEL) en las microsporas.

Otros procesos donde se observa PCD es durante la microgametogénesis en donde se observa la degradación del tapete en tiempos precisos para el buen desarrollo del grano de polen y durante la megagametogénesis se da la degeneración de tres de cuatro megasporas. Por otro lado, durante la germinación y crecimiento del tubo polínico se han observado de igual forma procesos de PCD y por último, durante la dehiscencia de la antera es necesario que cierto grupo de células mueran (en el estomio) para que se lleve a cabo la liberación de los granos de polen (Fig. 3) (Van Doorn y Woltering, 2005; Rogers, 2006).

Algunos factores ecológicos influyen en la muerte de las estructuras florales después de la polinización; por un lado es el alto costo de recursos requerido para su origen y manutención, y por otro es que debido a su arquitectura se corre el riesgo de una invasión por algún patógeno a través del estigma (Rogers, 2006).

Uno de los mejores ejemplos para resaltar la importancia de la PCD, es la producción de granos de polen funcionales ya que depende de la muerte del tapete, el cual es un tejido cuya principal función es nutrir y colaborar en la ornamentación del grano de polen (Balk y Leaver, 2001).

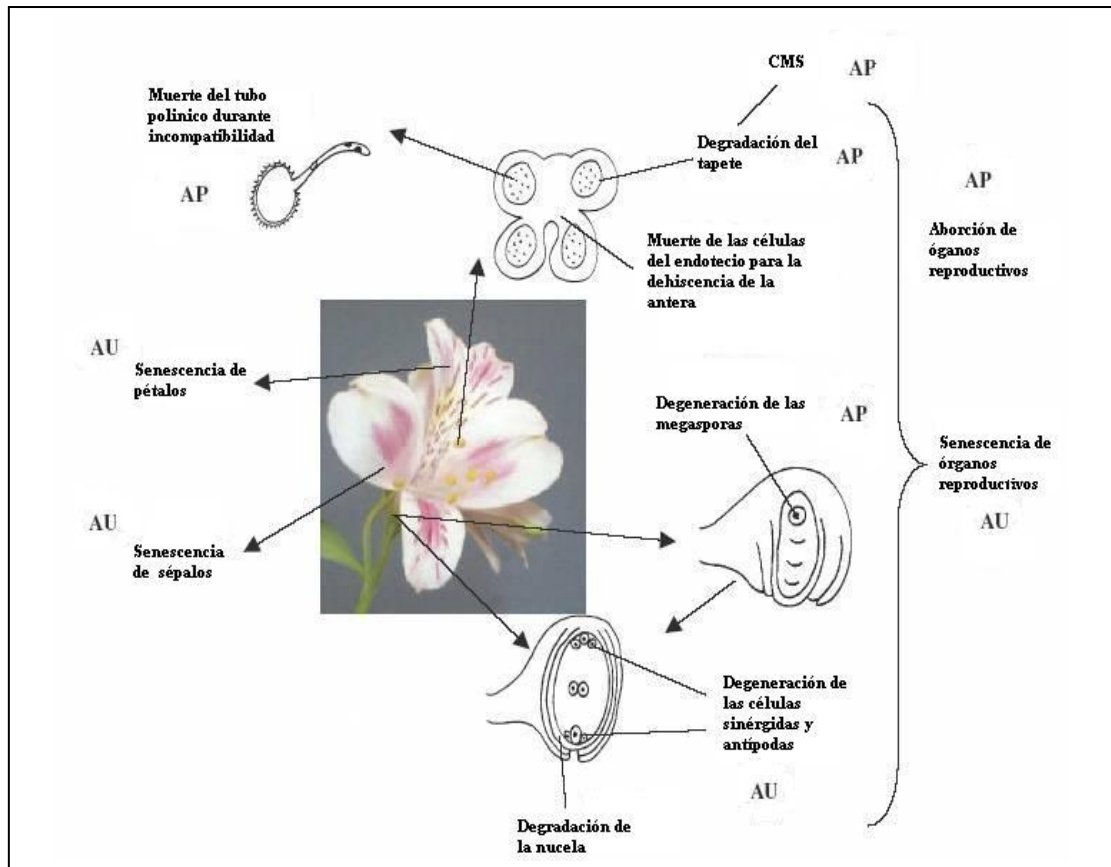


Figura. 3. Sitios de muerte celular programada en los órganos florales. CMS, esterilidad masculina citoplásmica. AU, mecanismos semejantes a autofagocitosis; AP, mecanismos semejantes a apoptosis (tomada de Rogers, 2006).

Liberación del citocromo c

Otro factor importante en el proceso de PCD es la liberación de componentes hacia el citosol. Se ha observado que la mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de PCD, ya que es en ella donde se lleva a cabo la respiración, proceso que involucra la transferencia de electrones de moléculas orgánicas al oxígeno. Esta transferencia ocurre por medio de una cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria. Los componentes respiratorios de esta cadena están arreglados en unidades multiprotéicas. Existen cuatro complejos asociados a la transferencia de electrones y estos son: *I*, cataliza la transferencia de electrones de NADH interno a ubiquinona; *II*, es el responsable de la transferencia de electrones del succinato a la ubiquinona; *III*, es generalmente llamado *complejo bc₁*, transfiere electrones de ubiquinol (forma reducida de ubiquinona) al citocromo *c*; *IV* también llamado *citocromo c-oxidasa*, cataliza la transferencia de electrones del citocromo *c* al oxígeno (Lambers, 1997).

Los citocromos son proteínas que transfieren electrones que contienen grupos ferro-porfirina; se encuentran solamente en las células aeróbicas. Algunos se hallan localizados en la membrana mitocondrial interna, donde actúan secuencialmente para transportar los electrones originados en varios sistemas de deshidrogenasas, hasta el oxígeno molecular. En la membrana interna de las mitocondrias en animales se han encontrado por lo menos 5 citocromos: *b*, *c*, *c₁*, *a*, *a₃*. El citocromo *c* es entonces una enzima que transfiere electrones, la cual está presente en animales, plantas y microorganismos aerobios y que se ha utilizado en estudios filogenéticos, así como para calcular la época probable en la que los géneros y especies iniciaron su divergencia (Lehninger 1990).

Se ha observado que en mamíferos, durante la apoptosis, es la mitocondria quien integra la información del metabolismo celular, la traduce, procesa y decide si la célula muere. En estudios recientes con plantas, ha sido demostrado el papel de la mitocondria en PCD y tal como pasa en mamíferos, también ocurre la liberación de ciertos componentes hacia el citosol incluyendo el citocromo, una vez que el citocromo *c* es liberado por la mitocondria al citosol, activa una cascada proteolítica mediada por proteínas parecidas a caspasas (metacaspasas) que conlleva a la fragmentación del DNA y desorganización de la célula (Adrain y Martin, 2001; Yao *et al.*, 2004) (Fig. 4).

Existen dos teorías que explican como puede llevarse a cabo la liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol. La primera es un “megacanal”, el cual se abre y permite la entrada de agua y solutos hacia la mitocondria que lleva a la ruptura de la membrana exterior de ésta, y trae como consecuencia la liberación del citocromo *c*. La segunda posibilidad son los canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC por sus siglas en inglés), los cuales están localizados en la membrana mitocondrial externa y son regulados por proteínas. En *Cucumis sativus* L., es posible que la liberación del citocromo *c* ocurra a través de canales de aniones, pero no está completamente demostrado (Balk *et al.* 1999).

Algunos procesos en células vegetales donde se ha observado liberación de citocromo *c* hacia el citosol son en la muerte inducida por menadiona en protoplastos de tabaco, muerte inducida por D-Manosa en maíz, en respuestas a estrés y durante el

desarrollo. Sin embargo se cuestiona que la liberación del citocromo *c*, sea un paso obligatorio en el proceso de PCD en plantas (Vacca *et al.*, 2006).

Se han realizado algunos estudios para determinar la relación entre la función de la mitocondria y PCD, se propone que los genes mitocondriales pueden causar degradación del tapete a través de la activación de diversos programas de PCD (Frank y Barr, 2003).

En el trabajo realizado por Balk y Leaver (2001) en *Helianthus annuus* L. se encontró una mutación en el genoma mitocondrial, la cual se asocia a la incapacidad de producir polen viable y se trata de un proceso de esterilidad masculina citoplasmática (CMS).

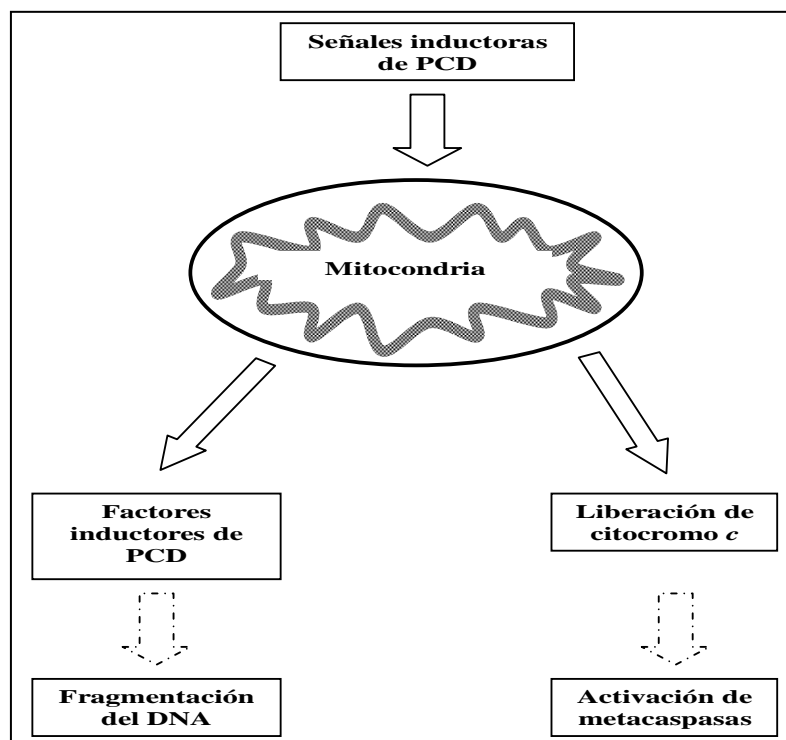


Figura. 4. Vía de señalización de PCD a través de la mitocondria. En este modelo la mitocondria juega un papel muy importante como receptora y amplificadora de señales para la PCD. Una vez que la mitocondria recibe estas señales, la conformación de su membrana cambia liberando una serie de componentes que provocan una activación de cascadas proteolíticas dando como resultado la muerte de la célula.

Como parte del desarrollo normal de la formación y liberación del polen, muchos tejidos de la antera sufren PCD en tiempos precisos. En plantas con CMS, las células del tapete se ven afectadas. Inicialmente las mitocondrias liberan el citocromo *c* hacia el

citósol, causando condensación celular, fragmentación del DNA y degradación de la membrana exterior de las mitocondrias, influyendo esto en el control respiratorio. Estos datos proveen evidencia de que las células con la mutación en el genoma mitocondrial causan una prematura inducción de la PCD en el tapete de *H. annuus*, la cual se extiende a las microsporas, lo que resulta en una esterilidad completa del androceo (Balk y Leaver, 2001).

El desarrollo floral es un proceso que como ya se mencionó se ve afectado por PCD. En la mayoría de las plantas unisexuales, las flores contienen primordios de ambos órganos, gineceo y androceo, en etapas tempranas de su desarrollo. A medida que avanza el desarrollo de la planta alguno de los órganos sexuales cesa su crecimiento y se atrofia, considerándose que la PCD puede estar interviniendo en estos procesos (Buchanan *et al.*, 2000).

Los estudios realizados por Orozco (2002), durante el desarrollo de las anteras de *Opuntia stenopetala* muestran que los primordios estaminales observados en etapas tempranas de flores pistiladas, tienen una morfología externa semejante a la que se presentan en flores estaminadas. La antera tiene un desarrollo normal hasta que las células de las microsporas se rodean de calosa, detienen aparentemente su desarrollo, no entran a meiosis y por lo tanto no se forma la tétrada de microsporas, sino que en su lugar se encuentran secreciones irregulares, que pueden ser producto de la degeneración del tapete, pudiendo ser esto por PCD. Se ha observado que las células madres de las microsporas de las flores femeninas entran en un proceso de muerte celular programada tal como lo determinó Flores (2005). Asimismo, la autora encuentra que la PCD fue detectada en todas las capas de la antera de las flores femeninas. Con respecto a *Opuntia robusta*, se ha observado un desarrollo parecido al de *Opuntia stenopetala*, pero no se ha evaluado la participación de la PCD.

Como se ha mencionadp en los párrafos anteriores es evidente que la muerte celular programada es un proceso que las plantas llevan a cabo de manera natural a lo largo de su desarrollo, por lo tanto es importante conocer cuáles son algunas de sus características y cómo está relacionada con el establecimiento de esterilidad masculina, con lo cual se podrá definir en qué momento ocurre la diferenciación sexual.

En esta tesis se plantea describir si en *O. stenopetala* y *O. robusta* la esterilidad masculina de las flores femeninas ocurre en la misma etapa de desarrollo y si se ven afectados los mismos tejidos y células. También se pretende conocer si la muerte celular programada interviene en ambas especies y si está caracterizada por la liberación de citocromo *c* como ocurre en otras familias de angiospermas.

HIPÓTESIS

Se observará fragmentación del DNA y liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol, por procesos de muerte celular programada en *Opuntia stenopetala* y *Opuntia robusta* durante el desarrollo de anteras en flores pistiladas.

OBJETIVOS

General

- Determinar si la muerte celular programada está relacionada con el detenimiento en el desarrollo del grano de polen *Opuntia stenopetala* y *Opuntia robusta*.

Particulares

- Corroborar si existe fragmentación de DNA en las anteras de las flores femeninas de *O. robusta*.
- Determinar si existe liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol en las anteras de flores femeninas de *O. robusta* y *O. stenopetala*.
- Determinar la etapa de desarrollo en que ocurre la PCD en anteras de flores femeninas de *O. robusta* y *O. stenopetala*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El material biológico de *Opuntia stenopetala* fue colectado en dos localidades ubicadas en el municipio de Cadereyta, en el estado de Querétaro. Dichas localidades se encuentran cerca de la carretera de Cadereyta a Vizarrón sobre la desviación a Bellavista, en el kilómetro 12 ($26^{\circ} 00.000' N 104^{\circ} 03.750' W$) y en el kilómetro 17 ($20^{\circ} 41.212' N 99^{\circ} 35.933' W$). *Opuntia robusta* se colectó en la localidad ubicada en el kilómetro 17 de la carretera entre San Juan del Río y Tequisquiapan, en el estado de Querétaro (Fig. 5).

Esta zona se encuentra aproximadamente a 1970 msnm, tiene un clima templado semihúmedo de tipo Cwa y Cwb. La temperatura anual oscila entre 12 a 18° C. La precipitación media anual es de 400 a 800 mm. La temporada de lluvias se concentra en los meses de mayo, junio y octubre. Las temperaturas más bajas se registran en los meses de diciembre y enero, mientras que las más altas en mayo y junio (Scheinvar, 2004). El tipo de vegetación es matorral xerófilo crasicaule y pastizal con presencia de *Yucca spp*, *Acacia spp* y *Quercus spp* (Bravo-Hollis, 1978).

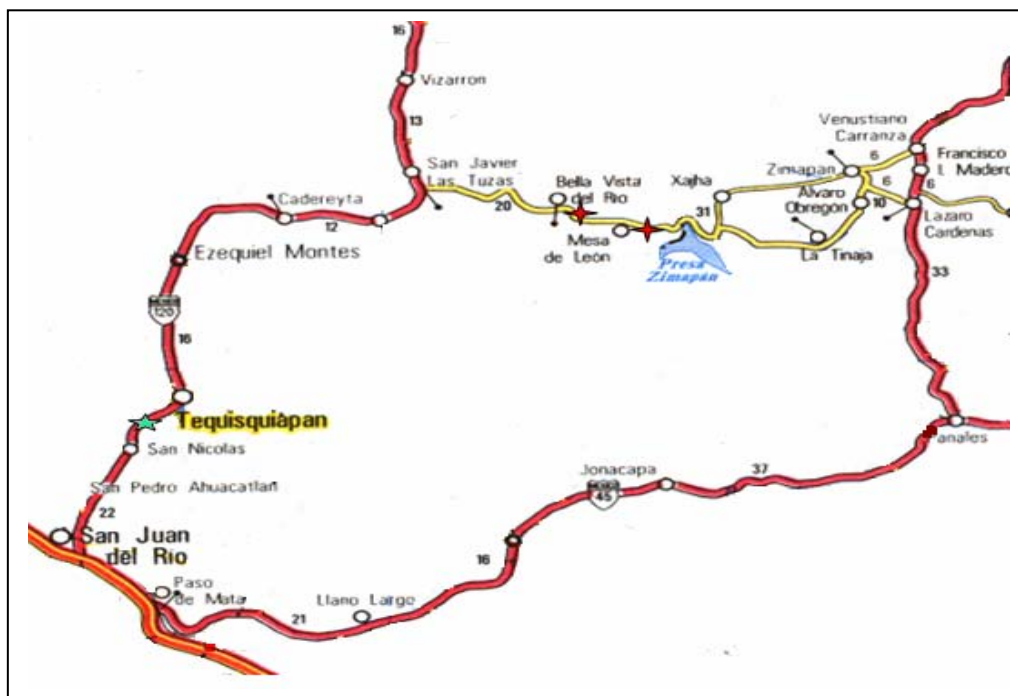


Figura 5. Mapa del Estado de Querétaro, ubicando los puntos de colecta

- ✚ *Opuntia stenopetala*
- ★ *Opuntia robusta*

Especies estudiadas

Opuntia robusta Wendland (Bravo-Hollis, 1978).

Planta arbustiva, muy ramificada, de 1 a 2 m de altura, tronco más o menos bien definido; ramas como de 1.5 m de largo. Los artículos son orbiculares o algo oblongos hasta obovados de 15 a 40 cm de longitud o más, muy gruesos de 1.5 a 2.5 cm de espesor, color verde azulado claro. Las aréolas están distantes entre sí de 4 a 5.5 cm, variables en tamaño, glóquidas numerosas, amarillentas a morenas. Espinas vigorosas, de 2 a 12, como de 5 cm de longitud. Las flores son grandes y amarillas, de 5 a 7 cm de longitud, lóbulos del estigma verdes. El fruto es globoso o elíptico con abundantes glóquidas amarillas, de color verde amarillento a purpurino. Se distribuye en la zona árida de los estados del centro de México: Zacatecas, Querétaro, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo y Michoacán (Fig. 6 A y B).

Floración. Siguiendo los estudios de Del Castillo y González (1988), la floración comienza en marzo para las flores masculinas y femeninas y en abril para las hermafroditas. Los tres morfos florales concluyen su floración en mayo



Figura 6. A. *Opuntia robusta*. B. Flor de *Opuntia robusta*.

Opuntia stenopetala Englemann (Bravo-Hollis, 1978).

Arbustos bajos, con frecuencia formando matorrales, las ramas principales son procumbentes, apoyándose en el suelo por el margen de los artículos o bien pendulosas y colgantes. Los artículos son oblongos u obovados hasta orbiculares, de 10 a 25 cm de longitud, color verde grisáceo, algunas veces rojizo-purpúreos, muy espinosos. Las aréolas están distantes entre sí de 1 a 3 cm. Las hojas solamente se encuentran en los artículos jóvenes, son color rojo oscuro, como de 2 mm de longitud. Las espinas, de 2 a 6, de 2 a 5 cm de longitud, glóquidas muy abundantes en los artículos jóvenes. Las flores son unisexuales, de color rojo anaranjado de 27 a 32 mm de longitud; estilo abortado en las flores masculinas, en las femeninas muy grueso, anaranjado con base verdosa, lóbulos del estigma generalmente de 8 a 9, amarillos. Frutos globosos, piriformes, de 5 cm de largo a 4.5 cm de ancho, color rojo púrpura. Las semillas son pequeñas, lisas, de 3 mm de espesor, discoideas, color moreno amarillento. Esta especie se distribuye en Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, Querétaro, Guanajuato e Hidalgo (Fig. 7).

Floración. De acuerdo con Orozco (2002), la floración de esta especie se da desde marzo hasta junio, encontrando frutos a partir de julio.



Figura 7. *Opuntia stenopetala*.

Colecta y procesamiento del material biológico

Se realizó una colecta de botones florales de individuos femeninos y masculinos de ambas especies. Posteriormente las muestras de cada especie se separaron según las etapas de desarrollo descritas en el trabajo de Orozco (2002) y Silva (2007) respectivamente. Las muestras fueron fijadas durante por lo menos 24 h en paraformaldehído al 4% en amortiguador de PBS 1X (apéndice I).

Deshidratación

Para eliminar el exceso de fijador de las muestras, éstas se enjuagaron con amortiguador PBS 1X, tres cambios de 30 minutos cada uno. Posteriormente fueron deshidratadas en etanoles graduales (70%, 85%, 95%, 100% y 100%).

Inclusión en paraplast

Para la inclusión en Paraplast, el material que se encontraba en etanol absoluto se pasó por Xilol por 15 minutos y después en mezclas de Xilol-Paraplast en proporción 1:1 durante 12 horas. Enseguida se impregnaron en Paraplast puro a 54-57° C durante 24 horas. Finalmente se incluyeron en Paraplast puro. Se hicieron cortes de 4-6 μm de grosor en un microtomo de rotación. Algunos cortes se desparafinaron durante 20 minutos en una estufa a 57° C, se pasaron por tres cambios de xilol, se hidrataron hasta etanol 96% (durante tres minutos cada uno) y se tiñeron con safranina- verde rápido en metilcelosolve (López *et al.*, 2005).

Inclusión en LR-White

Para la inclusión en LR-White el material se procesó en una mezcla de LR-White:Etanol 100%, 1:1, durante dos horas. Posteriormente se incluyeron en LR-White puro durante 12 horas (con 2 cambios). La polimerización se llevó a cabo en cápsulas de plástico en una estufa a 56° C en ausencia de oxígeno. Se hicieron cortes de 1 a 4 μm de grosor en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio. Algunas laminillas se tiñeron con azul de toluidina (López *et al.*, 2005).

Identificación de muerte celular programada (PCD)

Para identificar si existe muerte celular programada durante el desarrollo de los estambres en flores pistiladas de *O. robusta* y *O. stenopetala*, se exploró si existen los procesos de fragmentación del DNA (mediante la técnica de TUNEL) y liberación del citocromo *c* (mediante inmunolocalización).

Técnica de Tunel

Para observar la fragmentación del DNA se utilizó la prueba de TUNEL descrita en el manual de Roche (2002), la cual es una técnica *in situ* que detecta la condensación y fragmentación del DNA gracias a la incorporación de la fluoresceína 12-dUTP en los extremos libres 3'-OH.

En esta prueba se utilizaron cortes histológicos de los estambres en diferentes etapas del desarrollo previas, durante y posterior a la meiosis. Los cortes se montaron en portaobjetos especiales (Superfrost Plus, Merck) y se siguieron los siguientes pasos:

1. Los cortes se desparafinaron 30 min a 60° C. Si eran cortes en LR-White se hidrataron en PBS y se continuó con el paso número 5.
2. Se colocaron en xilol puro para desparafinarlos durante 10 min, se hicieron dos cambios.
3. Se hidrataron los cortes en etanoles graduales (100, 100, 96, 85, 70 %) 5 min en cada uno y se hicieron tres cambios con PBS 1X 3 min. cada uno.
4. Se secó el exceso de PBS.
5. Se marcaron con un PAP-PEN para aislar los cortes.
6. Se agregaron dos gotas de proteinasa K (maraca DAKO No. Cat.S3020) y se incubó a 30-35°C por 15 min. En este paso se hizo un alto y se separaron las preparaciones utilizadas como CONTROLES (Ver sección para control positivo y control negativo). El resto de las preparaciones fueron tratadas según el paso 7 y se esperó hasta terminar el tratamiento de las preparaciones control.
7. Las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS 1X cada una por tres minutos.
8. Se agregaron 50 µL de la reacción de TUNEL y se cubrieron con parafilm, se incubaron por 1:30 h en una cámara húmeda, en obscuridad a temperatura ambiente.

9. Pasado el tiempo se lavaron cada una de las muestras 4 veces con PBS 1X por 3-5 min. a temperatura ambiente (las preparaciones se mantuvieron en oscuridad entre cada lavado).
10. Se montó con medio de montaje para fluorescencia DAKO (DAKO Fluorescent mounting médium, No. cat. 002627) más DAPI 1µg/mL (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, ROCHE, No. Cat 236276) en una proporción 5:1 respectivamente.
11. Se selló con barniz de uñas y se guardaron las preparaciones a 4° C en oscuridad.
12. Las muestras se analizaron en microscopio confocal.

Control positivo

Después del paso seis:

- Se agregaron 50µL de la solución con DNasa I (3000 U/mL en buffer, para preparar 100 µL: 15 µL de DNasa I (20,000 U/mL de Invitrogen No. Cat. 18047-019), 10 µL de buffer, 75 µL de agua bidestilada). Las muestras se cubrieron con parafilm
- Se dejaron incubar por 10 min. y se continuó con el paso 7. (Al control positivo si se le añade mezcla de reacción de TUNEL).

Control negativo

Después del paso seis:

- Se agregaron 50 µL de la solución de marcaje (sin enzima) y se cubrieron con parafilm. Se dejaron incubar por 1:30 h en una cámara húmeda, en oscuridad a temperatura ambiente.
- Al transcurrir la 1:30 h se regresó al paso 9. (Al control negativo no se le añade mezcla de reacción de TUNEL).

Preparación de la mezcla de reacción de TUNEL

Del kit: *In situ* cell death detection kit, AP

No. Cat. 1684 809 de ROCHE

- Apartar 100 µL de solución de marcaje (vial 2), para dos controles negativos.
- Añadir el volumen total (50 µL) de solución de la enzima (vial 1) al remanente del vial 2 para obtener 500 µL de la mezcla de reacción de TUNEL.

Identificación de porina y liberación del citocromo *c*

Para determinar si existe liberación del citocromo *c*, se utilizó una inmunolocalización. En esta prueba se utiliza un anticuerpo primario, el cual se une al citocromo *c*. Como control y para saber cuando el citocromo *c* se encuentra dentro o fuera de la mitocondria, se utiliza otro anticuerpo primario el cual detecta una proteína integral de la membrana externa de la mitocondria, en este caso una porina. Esta inmunolocalización permite no solo ubicar al citocromo *c*, sino también determinar la densidad y distribución de las mitocondrias en los tejidos. Para realizar esta técnica el material se procesó de la misma manera que para la prueba de TUNEL, utilizando las mismas etapas de desarrollo. Se adicionaron además dos anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína que se unen a sus respectivos anticuerpos primarios y de esta manera al excitar la fluoresceína pueden ser observados en un microscopio confocal.

1. En esta prueba los cortes histológicos de LR-white se hidrataron con PBS 1x, se hicieron dos cambios de 5 min cada uno.
2. Al momento se prepararon 100 mL de solución de bloqueo (apéndice II).
3. Se agregó la solución de bloqueo y se dejó 2:30 h.
4. Una vez transcurrido el tiempo las preparaciones se lavaron con PBS 1X con dos cambios cada 5 min.
5. Al momento se preparó la solución de bloqueo con el anticuerpo primario (apéndice III).
6. Se agregó esta solución y las preparaciones se dejaron en una cámara húmeda y en oscuridad por 24 h.
7. Posteriormente se hicieron tres lavados con PBS 1X de 10 min cada uno.
8. Al momento se preparó la solución de bloqueo con el anticuerpo secundario (esta solución no tiene que exponerse a la luz) (apéndice IV).
9. Las muestras se dejaron incubar por 2:30 h.
10. Se lavaron con PBS 1X cinco veces de 10 min cada uno.
11. Se montó con medio de montaje para fluorescencia DAKO (DAKO Fluorescent mounting médium, No. cat. 002627) más DAPI 1µg/mL (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, ROCHE, No. Cat 236276) en una proporción 3:1 respectivamente.
12. Se selló con barniz de uñas y se guardaron las preparaciones a 4° C en oscuridad. Las muestras se analizaron en microscopio confocal.

RESULTADOS

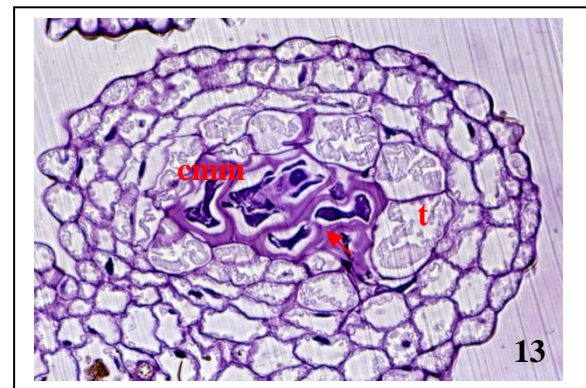
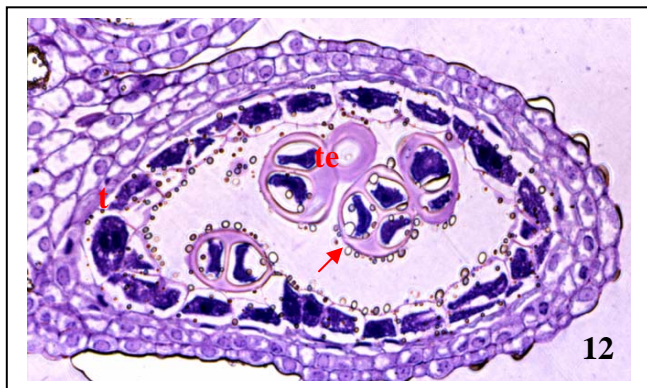
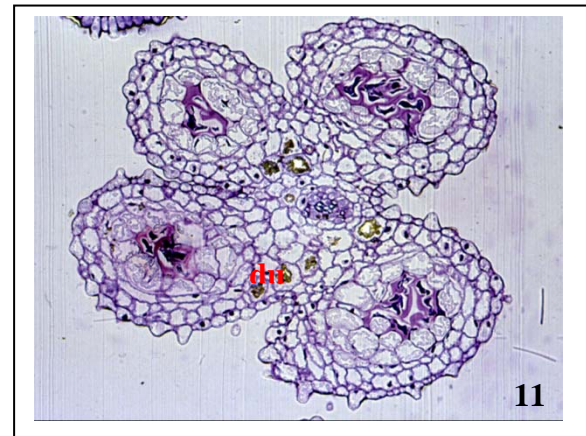
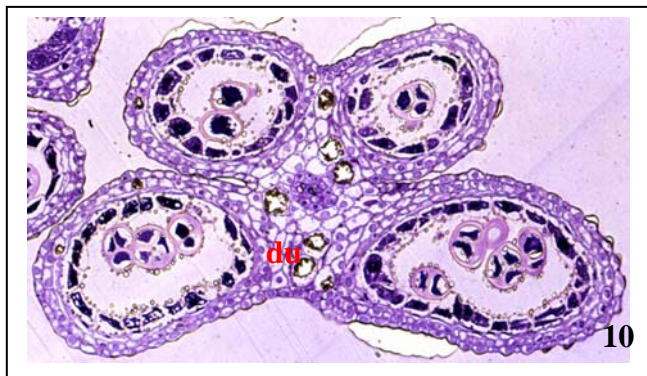
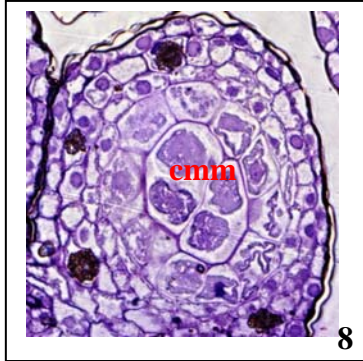
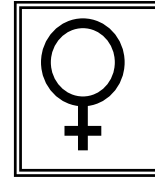
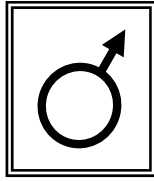
Opuntia stenopetala

DESARROLLO DE ANTERA EN FLORES ESTAMINADAS Y PISTILADAS

Basándonos en el estudio embriológico realizado por Orozco (2002), se seleccionaron las etapas cercanas a la meiosis de las células madres de las microsporas y es hasta cuando la célula madre de la microspora debe entrar a meiosis cuando se encuentran diferencias evidentes en el desarrollo. Tanto las anteras jóvenes de flores masculinas y de flores femeninas en *Opuntia stenopetala* son bilobuladas, tetraesporangiadas con drusas en el tejido conectivo. La capa de la antera de ambos morfos está formada de epidermis, endotecio, capa media y tapete (Figs. 8 y 9).

En las anteras de las flores estaminadas las células madres de las microsporas se preparan para entrar a meiosis depositando calosa alrededor de ellas. La meiosis posteriormente da como resultado la formación de tétradas tetraédricas con una pared de calosa regular. En esta etapa, la pared de la antera está formada por epidermis, endotecio, capa media y tapete, el cual tiene un citoplasma denso y cuerpos de Übish, que son secretados y sirven para la formación de la pared del grano de polen (Figs. 10 y 12).

Por otro lado en las anteras de las flores pistiladas, las células madres de las microsporas no entran a meiosis o bien se detienen en Profase I, por lo que no se forman ni diadas ni tétradas. Las células madres de las microsporas son rodeadas por depósitos irregulares de calosa y posteriormente se empiezan a degradar. Con respecto a la pared de la antera en esta etapa, está formada por epidermis endotecio, capa media y tapete, el cual se encuentra vacuolado, desorganizado y amorfo (Figs. 11 y 13).



Figuras 8-13. Cortes transversales de anteras de flores estaminadas y pistiladas en etapa de tétrada de *O. stenopetala*. 8. Microsporangio joven de flor estaminada, al centro cmm. 125X. 9. Microsporangio joven de flor pistilada con tejido esporógeno al centro rodeado de las 4 capas de la pared. 62.5X. 10. Antera tetraesporangiada, bilobulada con drusas en el tejido conectivo. Dentro de los microsporangios encontramos tétradas. 50X. 11. Antera de flor pistilada, donde se observa la antera con drusas y el tapete laxo. 50X. 12. Microsporangio de flor estaminada, donde se observa la pared de la antera conformada de epidermis, endotecio, capa media y tapete. El tapete es muy denso y segrega algunos cuerpos de Übish (flecha). En el centro del microsporangio encontramos las tétradas. 100X. 13. Microsporangio de flor pistilada donde se observan los restos de las células madres de las microsporas rodeadas de secreciones irregulares de calosa (flecha). La pared está compuesta por epidermis, endotecio, capa media y el tapete. El tapete se ve vacuolizado y laxo. 125X. **du:** drusas, **ts:** tejido esporógeno, **te:** tétradas, **t:** tapete, **cmm:** célula madre de la microspora.

Opuntia stenopetala

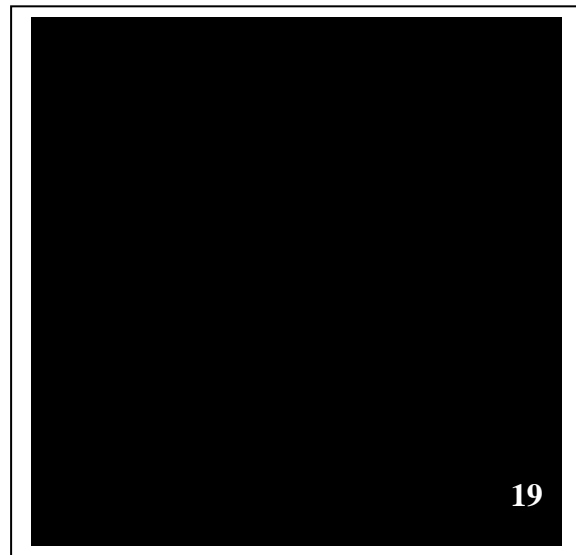
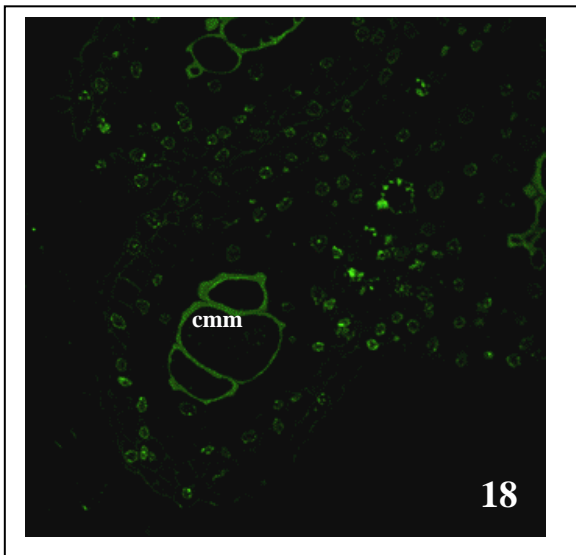
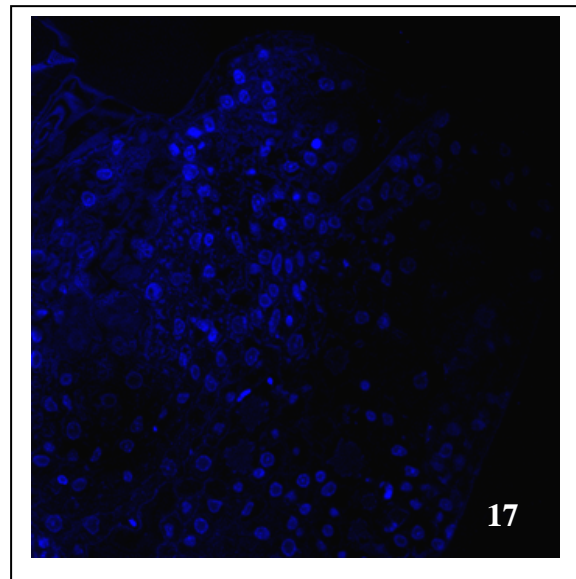
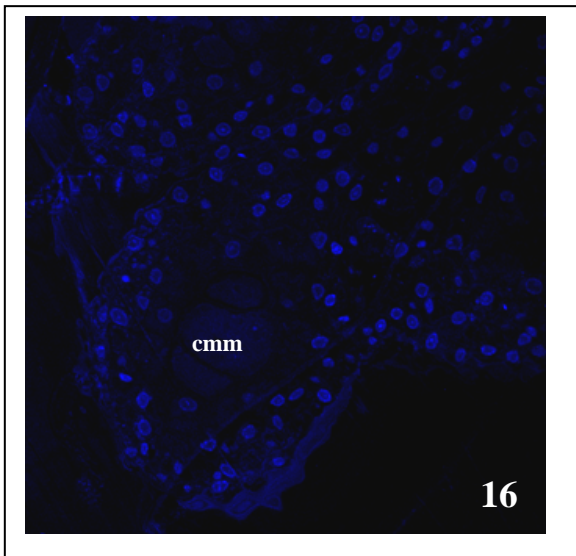
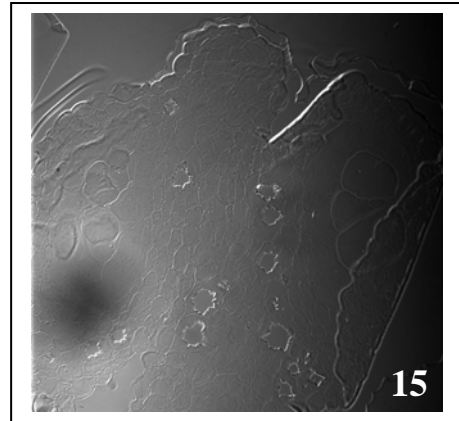
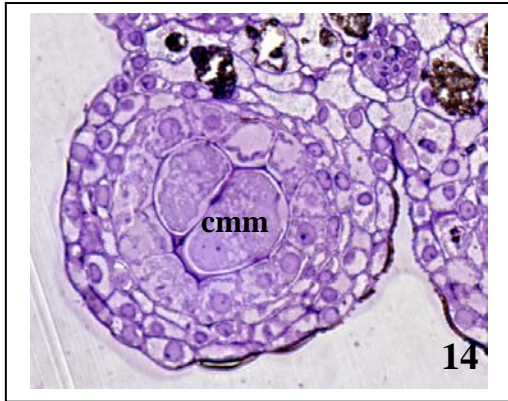
PRUEBA DE TUNEL EN ANTERAS ABORTIVAS DE FLORES PISTILADAS Y ANTERAS DE FLORES ESTAMINADAS

En las figuras 14, 16 y 17 observamos el control positivo el cual muestra ruptura de DNA en todas las células de la antera, también se agregó DAPI para identificar los núcleos.

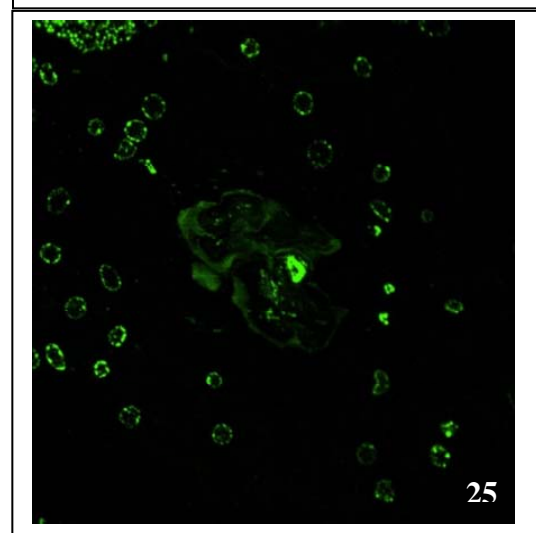
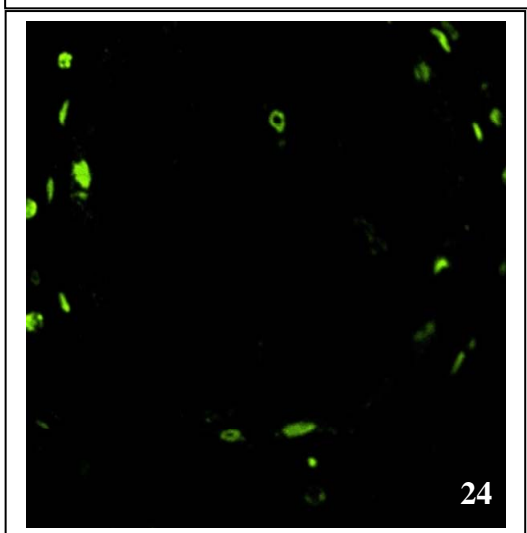
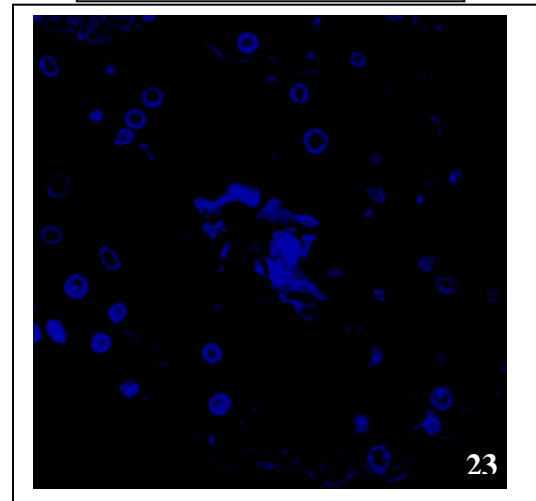
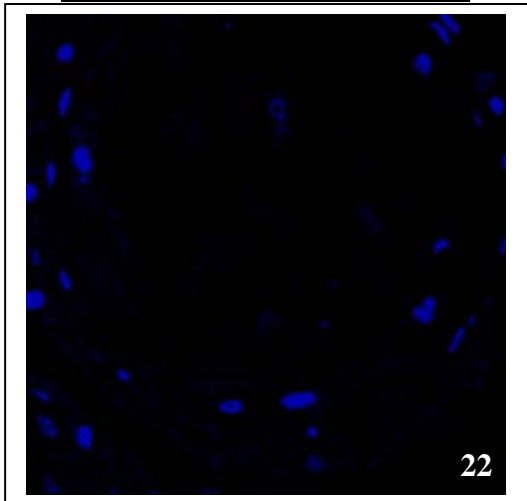
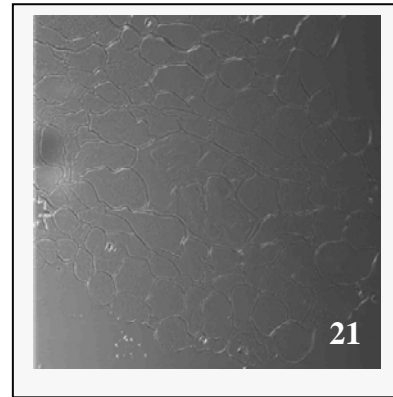
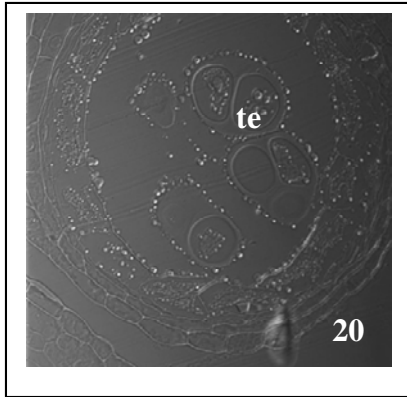
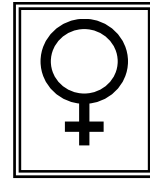
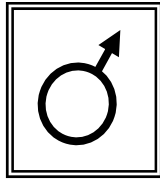
En las figuras 15, 18 y 19 observamos el control negativo, para el cual no se utilizó la enzima TdT (una enzima transferasa la cual ayuda a que el fluorocromo primario se una al extremo libre 3'-OH de los fragmentos de DNA) por lo que no se observa fluorescencia. En este control también se agregó DAPI para poder observar los núcleos.

Como ya observamos es en etapa de célula madre de la microspora cuando comienzan a presentarse ciertas irregularidades en el desarrollo de la antera. Al aplicar la prueba de TUNEL a las anteras de flores pistiladas, se observó que existe fragmentación del DNA en los núcleos de todas las capas de la pared de la antera y en el núcleo de la célula madre de la microspora la cual no entra a meiosis, sino que empieza a degradarse (Figs. 21, 23 y 25).

Al aplicar la prueba de TUNEL a las anteras de las flores estaminadas, observamos que existe fragmentación de DNA en algunos núcleos en las capas de la pared de la antera, epidermis, endotecio, capa media y tapete, pero no en las tétradas (Figs. 20, 22 y 24).



Figuras 14-19. Cortes transversales de microsporangio de flor pistilada en etapa de célula madre de la microspora de *O. stenopetala*. 14. Corte con azul de toluidina. Estructura del microsporangio del control positivo. En el centro las cmm. 15. Contraste de fases. Estructura de microsporangio del control negativo. 16. Corte con DAPI, donde se observan en azul todos los núcleos de la pared de la antera. 17. Corte con DAPI, donde se observan en azul todos los núcleos de la antera 18. Control positivo con DNasa donde se observan los núcleos de la pared de la antera en verde. Autofluorescencia de la calosa que rodea a la cmm. 19. Control negativo sin enzima TdT (no hay señal). **cmm**: célula madre de la microspora. Aumento: 40X



Figuras 20-25. Cortes transversales de microsporangios de flores pistiladas y estaminadas de *O. stenopetala*. 20. Contraste de fases, estructura del microsporangio de flor masculina. 21. Contraste de fases, estructura del microsporangio de flor femenina. 22. Corte con DAPI de la flor estaminada, donde se observan en azul todos los núcleos de la pared de la antera. 23. Corte con DAPI de la flor pistilada, donde se observan las capas de la pared de la antera. 24. Prueba de TUNEL positiva para núcleos de la pared de la antera en la flor estaminada. Las tétradas no presentan fluorescencia. 25. Prueba de TUNEL positiva para núcleos de la pared de la antera. Ligerá autofluorescencia de la calosa de la cmm **te**: tétrada. **cmm**: célula madre de la microspora. Aumento 40X

Opuntia robusta

DESARROLLO DE LA ANTERA EN FLORES ESTAMINADAS Y PISTILADAS

Se observó que *Opuntia robusta* tiene anteras tetrasporangiadas y bilobuladas. En etapa temprana la pared de las anteras está conformada por epidermis, endotecio, capa media, tapete y tejido esporógeno el cual se divide mitóticamente y da lugar a las células madres de la microsporas (Fig. 26).

Posteriormente las células madres de las microsporas se comienzan a rodear de calosa y aumentan su tamaño para entrar a meiosis. En esta etapa el tapete aumenta su tamaño y su citoplasma es denso. Una vez que las células madres de las microsporas tienen un tamaño suficiente ocurre la meiosis la cual forma tétradas tetraédricas de microsporas (Figs. 28 y30).

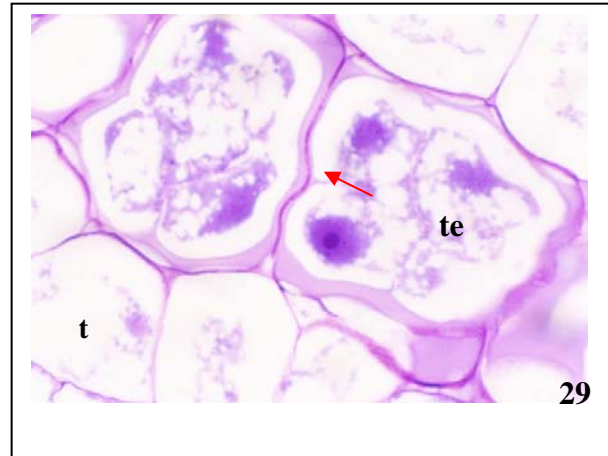
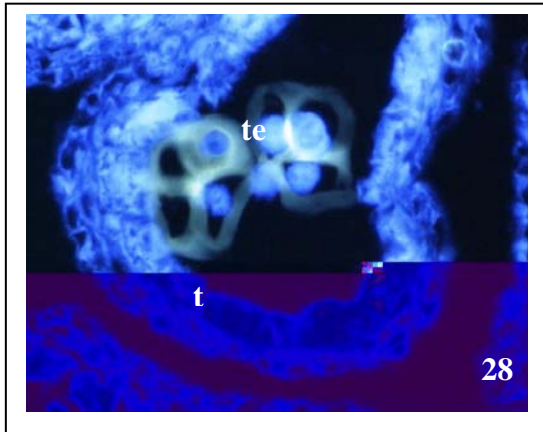
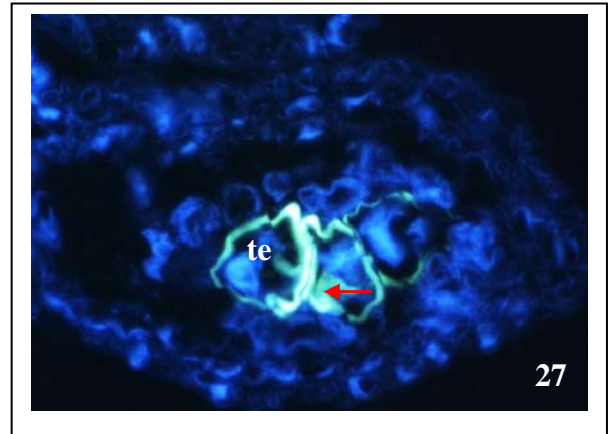
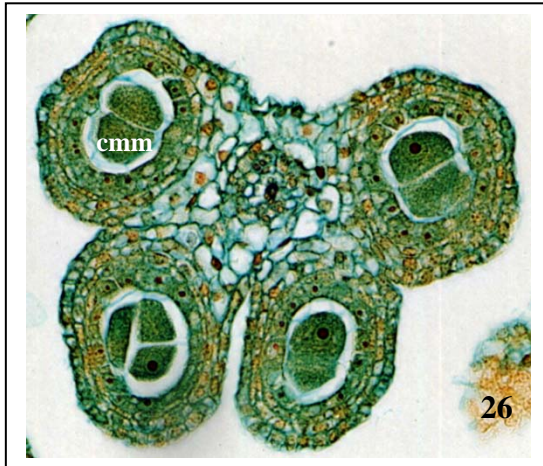
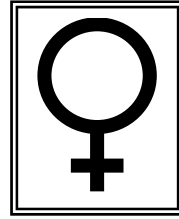
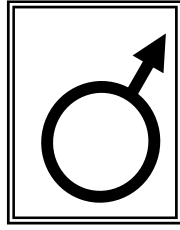
Las microsporas se liberan de la tétrada para formar un grano de polen. Por otro lado el endotecio aumenta su tamaño y forma engrosamientos. En esta etapa la capa media y el tapete comienzan a degradarse y a desaparecer. Antes de la antesis, la pared de la antera conformada ya solamente por epidermis y endotecio se adelgaza en la zona del estomio para llevar a cabo la dehiscencia longitudinal de la antera (Fig. 32).

La pared de la antera en las primeras etapas del desarrollo de flores pistiladas de *Opuntia robusta* es igual que la de las flores estaminadas y está conformada por epidermis, endotecio, capa media, tapete y tejido esporógeno el cual se divide mitóticamente y forma las células madres de las microsporas.

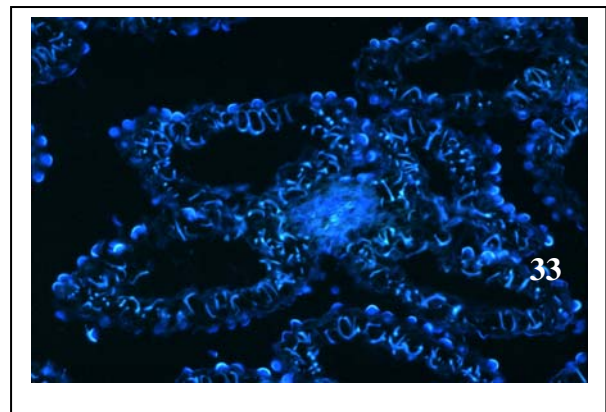
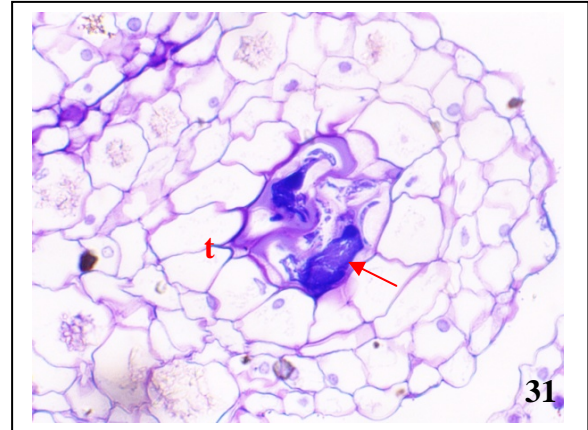
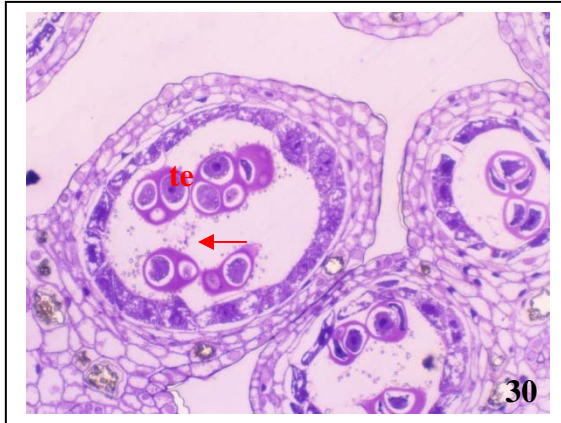
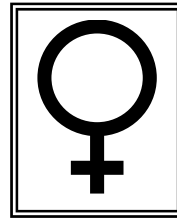
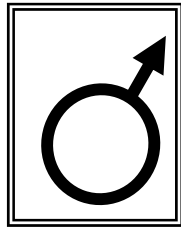
La diferencia crucial en el desarrollo de las flores pistiladas con respecto a las flores estaminadas es cuando las células madres de las microsporas comienzan a rodearse de calosa, en este caso los depósitos son irregulares y más delgados de los observados en las flores masculinas (Fig. 27), sin embargo, algunas células madres de las microsporas si llevan a cabo la meiosis y forman díadas, tríadas y tétradas de microsporas (Fig. 29). No obstante, las tétradas resultantes presentan ciertas

irregularidades, se colapsan y posteriormente degeneran antes de liberarse de la pared de calosa para formar al grano de polen joven (Fig.31).

Con respecto a la pared de la antera, el tapete se encuentra hipertrofiado y vacuolizado y comienza a degradarse durante la meiosis de las células madres de las microsporas. En etapas más avanzadas las anteras comienzan a colapsarse, la capa media y el tapete comienzan a degradarse. En anthesis, las anteras se encuentran vacías y la pared de la antera sólo esta formada por epidermis y endotecio, el estomio no se desarrolla por lo que la antera es indehiscente (Fig. 31 y 33).



Figuras 26-29. Cortes transversales de microsporangio de anteras de flores estaminadas y pistiladas en *O. robusta*. 26. Corte con safranina-verde rápido donde se muestra una antera estaminada, bilobulada y tetraesporangiada. Al centro la cmm. 50X. 27. Microsporangio de flor pistilada con tétradas de microspora, la cual muestra depósitos irregulares de calosa (flecha). 125X. 28. Microsporangio de flor estaminada con tétradas rodeadas de calosa. 125X. 29. Azul de toluidina. Acercamiento en un microsporangio de flor pistilada a tétradas de microspora con paredes de calosa muy delgadas (flecha). Tapete laxo. 200X. **te**: tétrada, **cmm**: célula madre de la microspora, **t**: tapete.



Figuras 30-33. Cortes transversales de microsporangio de anteras en flores estaminadas y pistiladas en *O. robusta*. 30. Azul de toluidina. Microsporangio de flor estaminada, que muestra la pared de la antera formada por epidermis, endotecio, capa media y tapete el cual es muy denso, en el centro tétradas. Se observan cuerpos de Úbish (flecha). 100X. 31. Azul de toluidina. Microsporangio de flor pistilada con tapete vacuolado e hipertrofiado. Al centro, tétrada degeradada (flecha). 125X. 32. Safranina-verde rápido. Pared de la antera en flore estaminada, formada por epidermis y endotecio, adelgazamiento en la zona del estomio (flecha). Granos de polen en el centro. 100X. 33. Antera de flor pistilada en etapa muy avanzada vacía e indehiscente, conformada por epidermis y endotecio. 50X **te**: tétrada, **t**: tapete.

Opuntia robusta

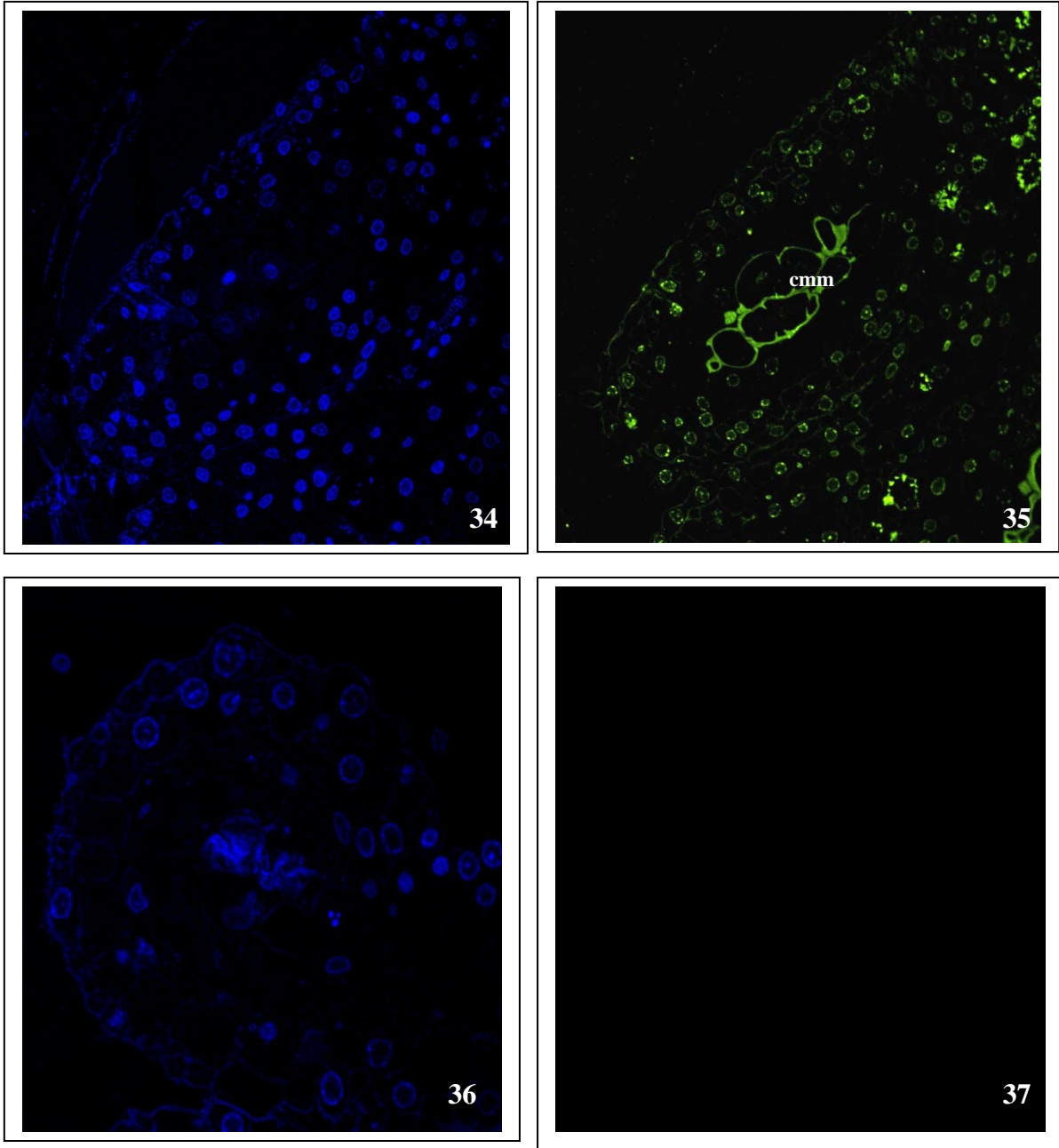
PRUEBA DE TUNEL EN ANTERAS ABORTIVAS DE FLORES PISTILADAS Y ANTERAS DE FLORES ESTAMINADAS

Para el caso de *Opuntia robusta* se realizaron los respectivos controles positivo y negativo. Para el control positivo se utilizó DNasa I y también se agregó DAPI para identificar los núcleos. Para el control negativo no se aplicó la enzima TdT, pero se agregó DAPI para observar los núcleos (Figs. 34-37).

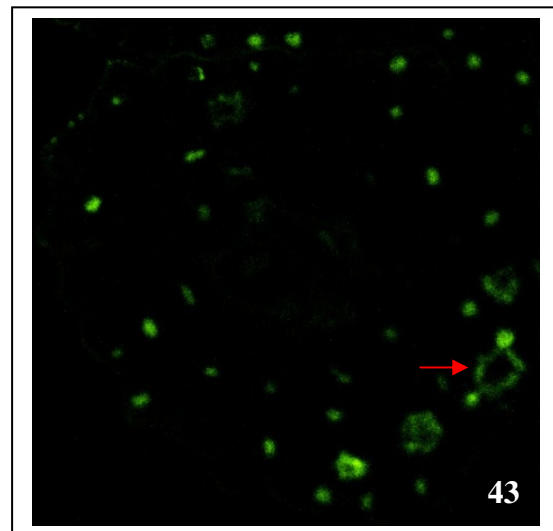
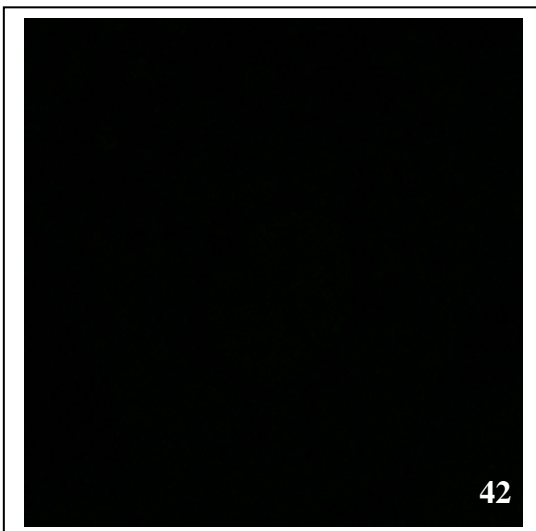
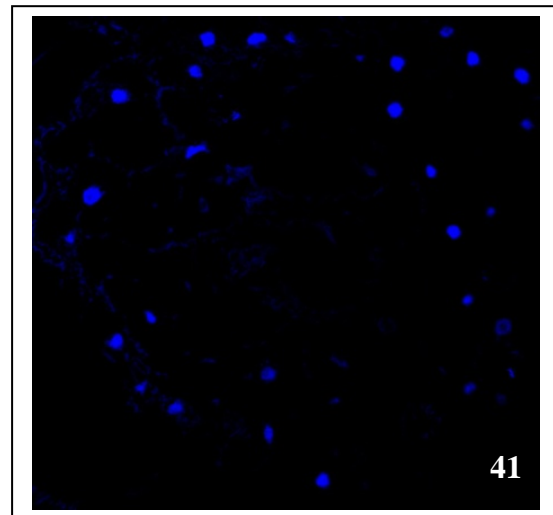
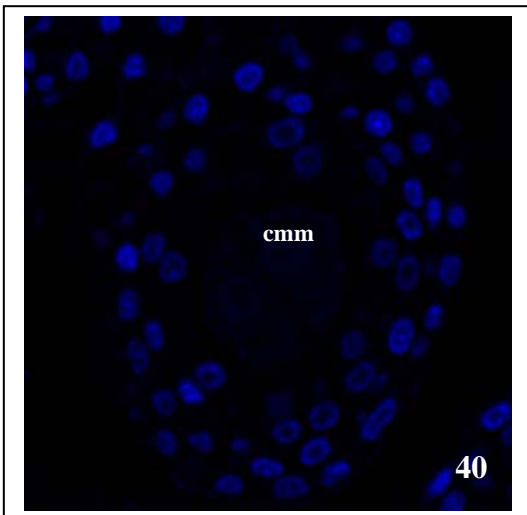
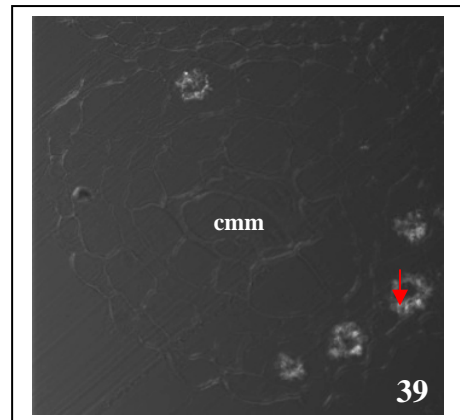
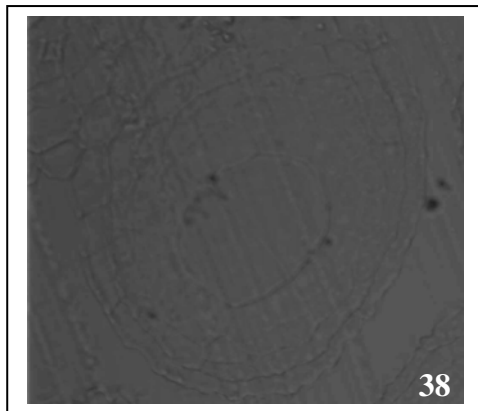
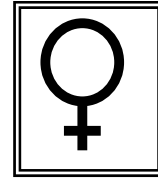
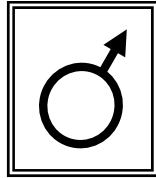
En las anteras de flores pistiladas en etapa de tétrada se observaron procesos de fragmentación de DNA en todas las capas de la pared, sin embargo, la célula madre de la microspora no mostró fluorescencia. Por otro lado, en las anteras de flores estaminadas no se observó fragmentación de DNA en ninguna de las capas de la pared (Figs.38-42).

En una etapa más avanzada en las anteras de flores pistiladas, la tétrada comienza a degradarse y el tapete laxo y vacuolizado presenta procesos de fragmentación así como todas las demás capas de la pared de la antera (Figs. 44 y 45).

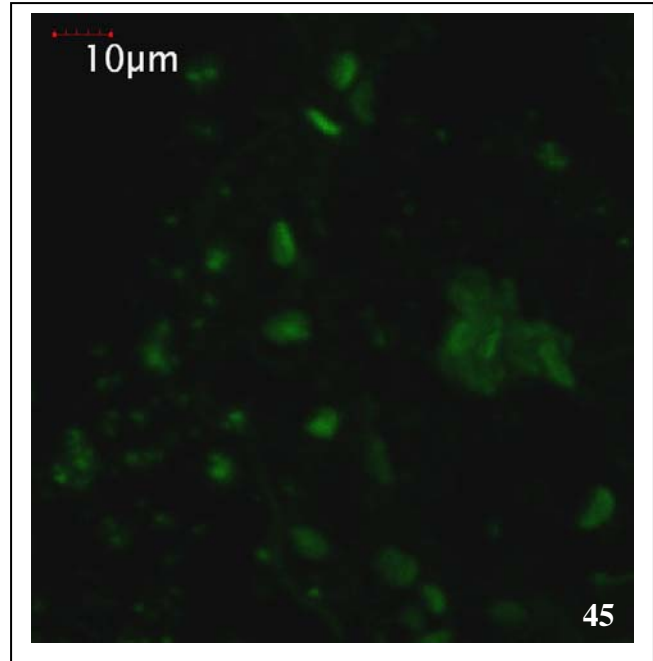
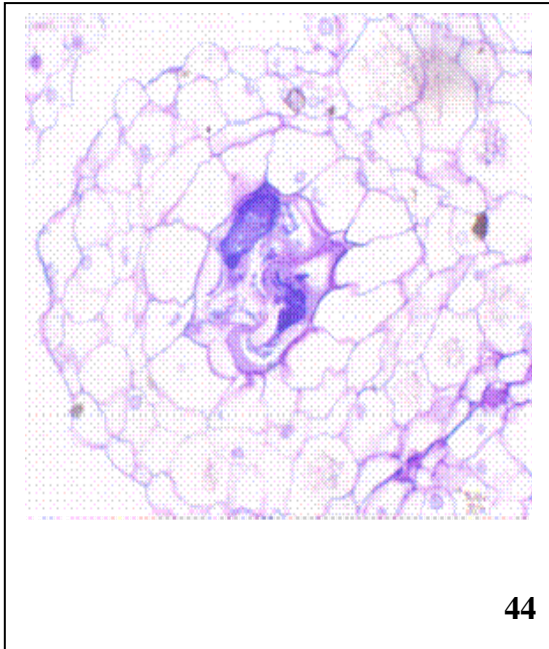
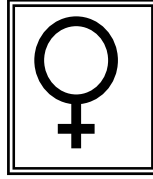
En etapas muy avanzadas, los microsporangios de las anteras de flores pistiladas solo están conformadas por la epidermis y el endotecio (el cual presenta engrosamientos) y ambas capas tienen fragmentación del DNA, en esta última etapa la antera se encuentra vacía ya que el tapete y la tétrada se degradan y son reabsorbidas (Fig. 46).



Figuras 34-37. Cortes transversales de microsporangio de flor pistilada en *O. robusta*. 34. Control positivo con DAPI, donde se observan en azul todos los núcleos de la pared de la antera. 35. Control positivo con DNasa donde se observan los núcleos de la pared de la antera en verde. Autofluorescencia de la calosa de la cmm. 36. Control negativo con DAPI, donde se observan en azul todos los núcleos de la pared de la antera. 37. Control negativo sin enzima TdT. **cmm:** célula madre de la microspora. Aumento: 40X



Figuras 38-43. Cortes transversales de microsporangios de flores pistiladas y estaminadas en *O. robusta*. 38. Contraste de fases, microsporangio de flor estaminada. 39. Microsporangio de flor pistilada donde se observa la epidermis, endotecio, capa media, tapete (laxo), en el centro cmm y drusas (flecha). 40. Control con DAPI de la flor estaminada, donde se observan todos los núcleos de la antera en azul. Al centro cmm en etapa de diada. 41. Control con DAPI de la flor pistilada, donde se observan todos los núcleos de la pared de la antera en azul. 42. Prueba de TUNEL negativa para los núcleos de la pared de la antera en flor estaminada. 43. Prueba de TUNEL positiva para núcleos de la pared de la antera en flor pistilada, no se observa fluorescencia en el núcleo de la cmm. Autofluorescencia de las drusas (flecha). **cmm**: célula madre de la microspora. Aumento 40X



Figuras 44 y 45. Cortes transversales de microsporangio de flor pistilada en etapa de tétrada en *O. robusta*. 44. Azul de toluidina. Microsporangio donde se observa la epidermis, endotecio, capa media y tapete (laxo), en el centro se observan restos de calosa y la tétrada degradada. 45. Prueba de TUNEL positiva para núcleos de la pared de la antera. Autofluorescencia en los restos de calosa de la tétrada degradada. Aumento 40X

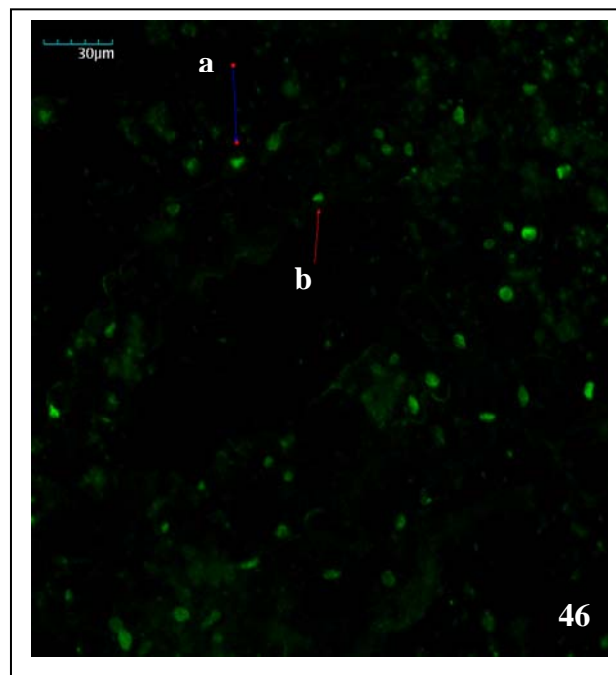


Figura 46. Microsporangio de flor pistilada en etapa madura. 46. Florescencia de los núcleos en las dos capas de la antera que permanecen hasta la etapa de antesis. epidermis (a) y endotecio (b). Aumento 40X

Opuntia robusta

INMUNOLocalIZACIÓN DEL CITOCROMO *c* Y LA PORINA EN ANTERAS DE FLORES PISTILADAS

Estas pruebas se realizaron en anteras de flores pistiladas en *Opuntia robusta*, sin embargo, ninguna de las proteínas pudo ser detectada (Fig. 47-50).

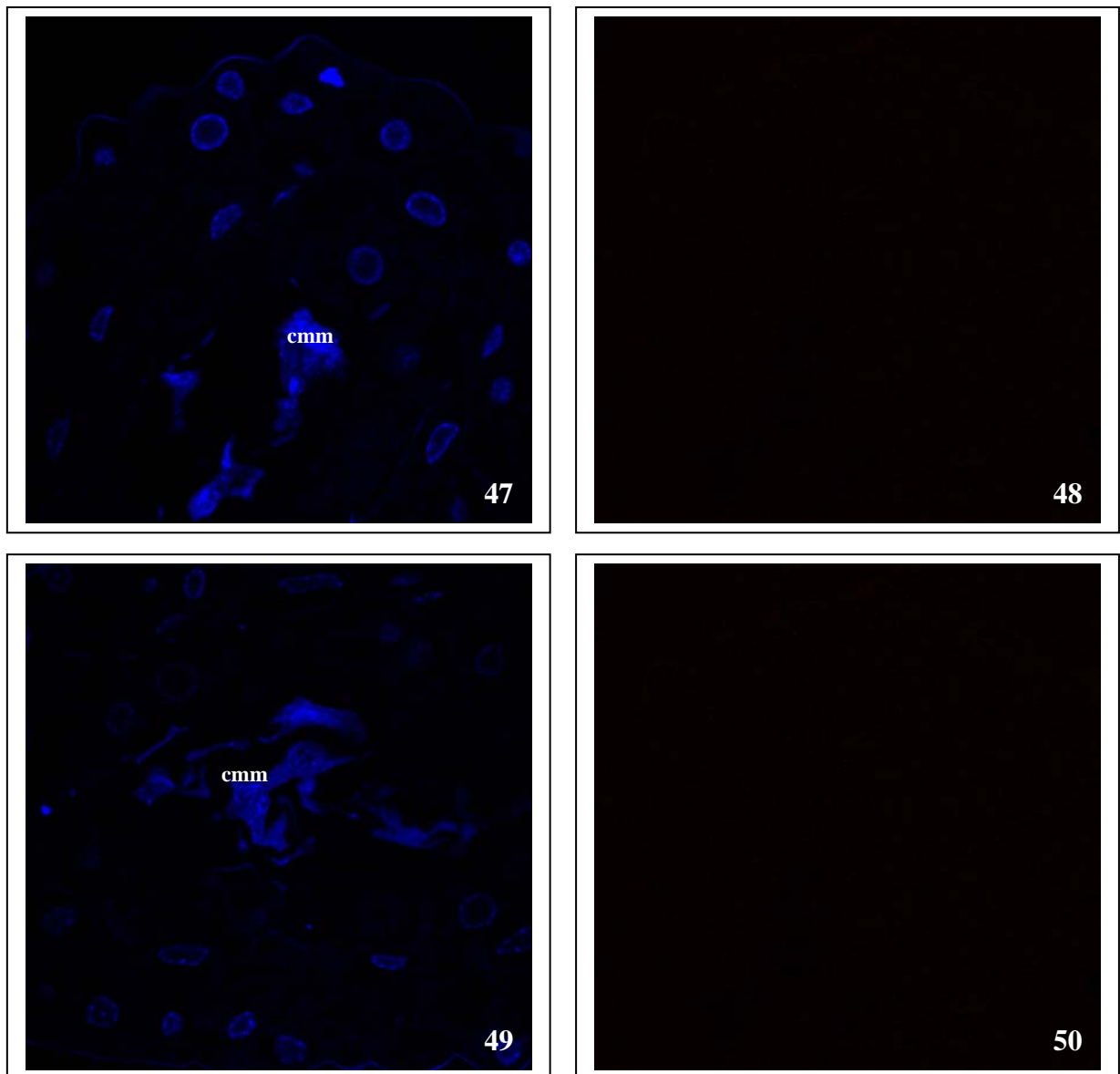


Figura 47-50. Microsporangio de flor pistilada de *O. robusta*. 47. Control con DAPI, donde se observan los núcleos de las capas de la antera. Al centro la cmm. 48. Immunolocalización para el citocromo *c*. 49. Control con DAPI, donde se observan los núcleos de las capas de la antera. 50. Immunolocalización para la porina. **cmm**: célula madre de la microspora. Aumento 40X.

DISCUSIÓN

Sistemas de reproducción sexual en la familia Cactaceae

En las angiospermas aproximadamente el 90% de las especies tienen un sistema de reproducción sexual ampliamente conservado: el hermafrodita. Sin embargo, el 10% de las especies tienen flores unisexuales. La unisexualidad es una condición distribuida en todas las familias, por lo que se cree que se ha originado de forma independiente en múltiples ocasiones (Renner y Ricklefs, 1995). La mayoría de las flores unisexuales presentan vestigios del sexo opuesto, lo cual indica que pudieron haber evolucionado de un sistema hermafrodita (Ainsworth, 2000; Barret, 2002; Mitchell y Diggle, 2005).

Dentro de la familia Cactaceae el sistema de reproducción hermafrodita también es el más común, tan solo se han reportado 25 especies con un sistema de reproducción unisexual. Sin embargo, no todas las especies que han sido descritas como unisexuales tienen un estudio embriológico que nos permita comparar su desarrollo floral (Silva, 2007).

Actualmente en la subfamilia Pereskioideae se está llevando a cabo un estudio embriológico en *Pereskia portulacifolia* (A. Camacho y S. Vázquez, com. pers.), mientras que *P. marcanoi* (Areces-Mallea, 1992), *P. quisqueyana* y *P. zinniiflora* aún no cuentan con mayor información acerca de su desarrollo floral (Leuenberger, 1986).

Dentro de la subfamilia Opuntioideae las especies que no tienen un estudio embriológico son: *Opuntia grandis*, *O. glaucescens* (Bravo-Hollis, 1978), *O. sanfelipensis*, *O. wolfii* (Rebman, 1998), *Consolea corallicola* (Negrón-Ortiz, 1998), *Opuntia calmalliana*, *O. molesta* (Rebman y Pinkava, 2001), *O. quitensis* (Anderson, 2001) y *O. quimilo* (Díaz y Cocucci, 2003).

Por otro lado, se ha observado que *Consolea rubescens* (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000) y *Consolea spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002), presentan anteras abortivas, sin granos de polen e indehiscentes en flores pistiladas, lo cual se ha observado en *Opuntia robusta* y *Opuntia stenopetala*.

En estas cuatro especies se ha observado las flores de los dos morfos sexuales comienzan como bisexuales y posteriormente uno de los dos órganos sexuales aborta. Strittmatter y Negrón-Ortiz (2000) reportan que en el caso de *Consolea rubescens* la microsporogénesis cesa en el morfo floral femenino, tal y como sucede en *O. robusta* y *O. stenopetala*.

Para el caso de *Consolea spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002), se ha observado en las anteras de las flores pistiladas ciertas anomalías en el desarrollo de las células madres de las microsporas, ya que éstas degeneran antes de entrar a meiosis, aunque en algunos casos pueden llegar a entrar a profase I e incluso formar tétradas. Esto último lo observamos frecuentemente en *O. robusta*, donde las células madres de las microsporas si entran en meiosis y forman tétradas (Silva, 2007). En contraste con estas especies las células madres de las microsporas de *O. stenopetala* no entran en meiosis o bien degeneran en profase I (Orozco, 2002). Con respecto al desarrollo de la pared de las anteras en flores pistiladas, en las tres especies mencionadas, se ha observado que la degeneración empieza en las células del tapete las cuales se vacuolizan. En una etapa muy avanzada, las anteras de todas las especies son indehiscentes, se encuentran colapsadas, vacías y solo están conformadas por la epidermis y el endotecio (Strittmatter *et al.*, 2002; Orozco, 2002 y Silva, 2007).

Dentro de la subfamilia Cactoideae, las especies que no cuentan con un estudio embriológico son: *Mammillaria neopalmeri* (Lindsay y Dawson, 1952), *Selenicereus innesii* (Kimmach, 1982), *Echinocereus coccineus* (Hoffman, 1992), *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Valiente *et al.*, 1997), *E. yavapaiensis* (Baker, 2006) *Pachycereus fulviceps* (Arias *com. pers.*). Actualmente se está llevando a cabo el estudio embriológico de *N. mezcalaensis* y *P. fulviceps* en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM (S. Vázquez *com. pers.*).

Para *Mammillaria dioica*, Sánchez (2007), observó que en las anteras de flores pistiladas, las células madres de las microsporas no entran a meiosis y las pocas que continúan su desarrollo se detienen y degeneran en metafase I, lo cual concuerda con *O. stenopetala*, debido a que en esta especie las células madres de la microspora tampoco entran a meiosis o bien degeneran en una etapa temprana de ésta. Sin embargo *O. robusta* si llega a formar tétradas de microspora lo que se ha observado también en

Pachycereus pringlei, incluso en esta especie se llegan a formar granos de polen los cuales se encuentran hipertrofiados, con la pared de la exina discontinua y no son viables (Nuñez, 2004).

En cuanto al desarrollo de la pared en todas las especies anteriores, se observa un desarrollo anormal, empezando por las células del tapete las cuales se hipertrofian, en el caso de *M. dioica* el tapete se divide y en su estrato interno se forman engrosamientos fibrosos, mas al iniciar la meiosis el tapete degenera. Los engrosamientos fibrosos en el endotecio es una característica que solo ha sido observada en *M. dioica*, en *O. stenopetala* y *O. robusta* se llegan a observar ciertos engrosamientos pero no de tipo fibroso.

Esterilidad masculina y muerte celular programada

La esterilidad masculina en plantas es una falla en la producción de anteras, polen o gametos masculinos funcionales, y se considera como el primer paso en la evolución al dioicismo, principalmente a partir de poblaciones hermafroditas (Charlesworth y Charlesworth, 1979). En la actualidad se propone que la esterilidad masculina se lleva a cabo por un proceso de muerte celular programada, el cual puede ser activado por factores bioquímicos, moleculares, genéticos, fisiológicos y ecológicos.

Recientemente, diversos estudios embriológicos nos permiten observar que en la mayoría de las especies unisexuales el meristemo tiene los dos verticilos sexuales y no es sino hasta etapas posteriores en las que uno de los dos se atrofia, esto sucede tanto en *O. stenopetala* como en *O. robusta*, y coincide con la vía de aborción propuesta por Mitchell y Diggle (2005).

Por otro lado, se ha observado que la muerte celular programada es un proceso que las plantas llevan a cabo frecuentemente durante su desarrollo y que este proceso puede darse a un nivel celular, de tejidos, de órganos e incluso hasta el de individuo (Quirino *et al.*, 2000; Dahiya, 2003; Nooden 2004; Shishkova y Dubrovsky, 2005; Van Doorn y Woltering, 2005; Rogers, 2006). Con respecto a las estructuras florales, la PCD es un proceso involucrado desde la diferenciación de los órganos sexuales hasta la antesis (Rogers, 2006).

De acuerdo con Van Doorn y Woltering (2005), se proponen tres tipos de PCD en plantas: la autofagocitosis, la apoptosis y la no lisosomal. En *O. stenopetala* y *O. robusta* el tipo de PCD encontrada concuerda con el apoptótico, sin que se lleve a cabo la ruptura celular, lo cual se debe posiblemente a la dificultad de este proceso en células con pared celular como las vegetales. Algunas de las características para la apoptosis y observadas en las anteras de flores femeninas de nuestras dos especies son: 1) la condensación de la cromatina, 2) la contracción celular y 3) la fragmentación del DNA.

Algunos trabajos han demostrado la fragmentación del DNA de distintas células de la antera mediante la técnica de TUNEL tales son los realizados en *Actinidia deliciosa*, *Helianthus annuus* y *Opuntia stenopetala* (Coimbra *et al.*, 2004; Balk y Leaver, 2001; Flores, 2005).

En *A. deliciosa* (Coimbra *et al.* 2004), no se encuentran diferencias en el desarrollo de las anteras de flores femeninas y masculinas sino hasta que las microsporas son liberadas de la tétrada y la calosa empieza a disolverse. En esta especie se observó la fragmentación de DNA en etapa microspora e inclusive células con apariencia de polen, lo cual es contrario a lo observado en *O. stenopetala*, en donde no se forman tétradas, y para *O. robusta* que si llega a formar tétradas pero no se liberan las microsporas. Con respecto a las capas de la antera en este estudio no se reportan resultados de la prueba de TUNEL.

En *H. annuus* (Balk y Leaver, 2001), las plantas con la mutación PET1-CMS en el citoplasma tienen esterilidad masculina, debido a la muerte del tapete y los meiocitos cerca al final de la meiosis. La primera característica que se observa en las anteras estériles es la pérdida de forma de las células del tapete y de las microsporas, ya que estas se condensan en etapa de paquíteno. Por otro lado las células de la capa media, del endotecio y de la epidermis se expanden. Estas características morfológicas concuerdan con las observadas en *O. stenopetala* y *O. robusta*, solo en diferentes etapas de desarrollo de la antera. En las pruebas de TUNEL realizadas al DNA nuclear, se determinó que en todos los tejidos de la antera, el DNA se encontraba fragmentado en la etapa de tétrada lo cual concuerda con nuestras especies estudiadas, ya que en *O. robusta* observamos fragmentación de DNA en todas las capas de la pared en la misma

etapa, y en *O. stenopetala* la fragmentación del DNA de todos los núcleos de las capas de la pared se da en una etapa más temprana, la de célula madre de la microspora.

Liberación del citocromo c

En los últimos años se ha propuesto la participación de la mitocondria en la regulación de la PCD en plantas. La mitocondria colectaría las señales inductoras de PCD, procesaría esta información y ejecutaría la señalización para la muerte de la célula (Jones, 2000; Yao *et al.*, 2004). De igual forma la liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol ha sido asociada para la activación de la PCD, por ejemplo en la respuesta hipersensitiva (HR, por sus siglas en inglés), la cual es una estrategia de defensa de las plantas contra un patógeno ya sea bacteriano o fúngico.

Otro ejemplo donde se ha observado la liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol es en el estudio realizado por Balk y Leaver (2001) en *H. annuus*. En esta especie, la liberación del citocromo *c* se observa en las células del tapete tanto en las anteras fértiles, durante la etapa de tétradas, como en las anteras estériles durante la etapa de paquíteno. Esto coincide con los primeros signos morfológicos de desarrollo anormal. Sin embargo, la liberación del citocromo *c* hacia el citosol no fue observada en todos los tejidos con características apoptóticas.

Por otro lado, la liberación del citocromo *c* no ha sido observada en todos los procesos de PCD, tal es el caso de la senescencia de los pétalos y la formación de traqueidas (Vianello *et al.*, 2007).

En nuestro estudio no fue posible identificar si hubo liberación de citocromo *c* al citosol, probablemente por que los anticuerpos utilizados no están dirigidos al citocromo *c* de plantas. Pero no hay que olvidar que aún cuando *O. robusta* y *O. stenopetala* muestran características morfológicas muy parecidas a las reportadas en *H. annuus*, no necesariamente se daría liberación de citocromo *c*, pues como se ha reportado existen procesos de PCD donde esto no se lleva a cabo. Sería muy interesante observar si se presenta, en que capas de la pared de la antera ocurre, así como la etapa y si ésta coincide con las características morfológicas de la PCD.

CONCLUSIONES

En *Opuntia stenopetala* y *Opuntia robusta*, observamos características típicas de la PCD tales como: vacuolización e hipertrofia del tapete, degradación celular y fragmentación del DNA.

Al aplicar la técnica de TUNEL en nuestras especies, observamos que en *Opuntia stenopetala* existe fragmentación del DNA en todas las capas de la pared de la antera de flores pistiladas, desde la etapa de célula madre de la microspora; esto mismo se observa en las anteras de *Opuntia robusta*, aunque en esta especie, algunas células madres de las microsporas si entran en meiosis y llegan a formar tétradas.

No fue posible observar la liberación de citocromo *c*, ni la localización de las mitocondrias en ninguna de las especies estudiadas, por lo que en el primer caso no podemos concluir si se lleva a cabo o no

LITERATURA CONSULTADA

- Adrain, C. y S. Martin. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by de cytochrome seas. *Trends Plant Sci.* **26 (6)**: 390-397.
- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* **86**: 211-221.
- Ameisen, J. 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell death and differentiation* **9**: 367-393.
- Anderson, E. F. 2001. The cactus family. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 776pp.
- Areces-Mallea, A. 1992. *Pereskia marcanoi*, a new species of Cactaceae from Hispaniola. *Brittonia* **44 (4)**: 423-428.
- Arias, S. 1997. Distribución general. En: Valles, C (ed.) *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México, D.F. 17-25.
- Arreola, H. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: Valles, C (ed.) *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México, D.F. 27-35.
- Baker, M. 2006. A new florally dimorphic hexaploid, *Echinocereus yavapaiensis* sp. Nov. (Section *Triglochidiatus*, Cactaceae) from central Arizona. *Plant Systematics and evolution* **258**: 63-83.
- Balk, J., C.J. Leaver y P. McCabe. 1999. Translocation of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett.* **463**: 151-154
- Balk, J. y C.J. Leaver. 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* realease. *Plant Cell* **13**: 1803-1818.
- Barret, S. 2002. The evolution of plants sexual diversity. *Nature* **3**: 274-284.
- Bawa, K. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **11**: 15-39.
- Bawa, K. y J. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **68**: 254-274.
- Bemis, P., J. Berry y A. Deutschman. 1972. Observations on male sterile Mammillariae. *Cactus and Succulents Journal* **44**: 256.

- Benson, L. 1982. The cacti of the United States and Canada. Stanford University Press. California. 1044pp.
- Bhojwani, S. y S. Bhatnagar. 1974. The embrology of angiosperms. 4ª edición. Vikas Publishing House Pvt. Ltd. Nueva Delhi.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 743pp.
- Buchanan, B., W. Gruissen y R. Jones. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant and Psysiologists. USA. 1367pp.
- Camacho V. A., M. Collazo-Ortega, J. Márquez-Guzmán, S. Rodríguez y S. Vázquez-Santana. 2007. *Desarrollo de las flores masculinas de la especie dioica Pereskia portulacifolia (Linnaeus) De Candolle (Cactaceae)*. Memorias del XVII Congreso Mexicano de Botánica. Zacatecas, México.
- Charlesworth, B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and ginodioecy. *American naturalist* **112**: 975-997.
- Charlesworth, D. y Charlesworth B. 1979. The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants. *Proc. R. Soc. Lond.* **205**: 513-530.
- Chaundry, A. 1993. Nuclear genes controlling male fertility. *The Plant Cell* **5**: 1277-1283.
- Coimbra, S., L. Torrao e I. Abreu. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiology and Biochemistry.* **42**: 537-541.
- Dahiya, P. 2003. Role of death in providing lifeline to plants. *Trends Plant Sci.* **8 (10)**: 462-465.
- Del Castillo, R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo. México. 133pp.
- Del Castillo, R. y M. González. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* **71**: 185-196.
- Dellaporta, S., A. Calderon-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* **5**: 1241-1251.
- Dewey R., D. Timothy y C. Levings. 1987. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 5274-5378.

- Díaz, L y A. Cocucci. 2003. Funcional gynodioecy in *Opuntia quimilo* (Cactaceae), a tree cactus pollinated by bees and hummingbirds. *Plant Biology Stuttgart* **5** (5): 531- 539.
- Fleming, T., S. Maurice y J. Hamrick. 1998. Geografic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae), *Evolutionary Ecology* **12**: 279-289.
- Flores, Ll. 2005. Esterilidad en flores femeninas de *Opuntia stenopetala* Engelmann (Cactaceae). Tesis de maestría (Biología experimental). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 87pp.
- Frank, S. y Barr M. 2003. Programmed cell death and hybrid incompatibility. *Journal of Heredity* **94** (2): 181-183
- Guzmán, L. 1997. grupos taxonómicos. En: Valles, C (ed.) *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México, D.F. 37-41.
- Hernández, R. 2008. Estudio de la muerte celular programada en el gineceo de las flores masculinas de *Opuntia robusta* J.C. Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 72pp.
- Hoffman, T. 1992. Funcional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geografhic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany* **79** (12): 1382-1388.
- Jones, A. 2000. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.* **5**: 225-230.
- Kimmach, M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the Wes Indies. *Cactus and Succulent Journal* **54**: 3-7.
- Lambers, H. 1997. Oxidation of mitochondrial NADH and the synthesis of ATP. En: Dennis D.T., D.H. Turpin, D.D Lefebure y D.B Layzell (Eds). *Plant metabolism*. Addison Wesley Longman. Inglaterra. 200-219.
- Lehninger, A. 1990. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. 1117pp.
- Leuenberg, B. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). *Memories of the New York Botanical Garden* **41**: 141.
- Lindsay, G y E. Dawson. 1952. *Mammillaria* of the islands of Northwestern Baja California, Mexico. *Cactus and Succulent Journal* **24**:76-84.
- López, L., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Laboratorio de Desarrollo en Plantas. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 178pp.

- Mitchell, C. y P. Diggle. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *American Journal of Botany* **97** (7): 1068-1076.
- Negrón-Ortiz, V. 1998. Reproductive biology of a rare cactus, *Opuntia spinosissima* (Cactaceae), in the Florida Keys: why is seed set very low? *Sex Plant Reprod* **11**: 208-212.
- Negrutiu, I., B. Vyskot, N. Barbacar, S. Georgiev y F. Moneger. 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* **127**: 1418-1424.
- Nooden, L. 2004. Plant cell death processes. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 392pp.
- Núñez, M. 2004. Cactáceas columnares de México: estudio embriológico de cinco especies de la tribu *Pachycereeae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 178pp.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelmann (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 82pp.
- Orozco, G. 2005. Clonación de TSL y STY en *Opuntia stenopetala*. Dos genes asociados al desarrollo del estilo y el estigma. Tesis de maestría (Biología experimental). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 87pp.
- Quirino, B., Y. Noh, E. Himelblau y R. Amasino. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* **5** (7): 278-282.
- Raghavan, V. 1997. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press. USA. 690pp.
- Rebman, J. 1998. A new cholla (Cactaceae) from Baja California, México. *Haseltonia* **6**: 17- 21.
- Rebman, J. y D. Pinkava. 2001. *Opuntia* cacti of North America, an overview. *Florida entomologist* **84** (4): 474-483.
- Renner, S. y R. Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* **82** (5): 596-606.
- Roche. 2002. *In situ* cell death detection kit, AP. Instruction manual. Roche Diagnostics GmbH. Alemania. 25pp.
- Rogers, H. 2006. Programmed cell death in floral organs: how and why do flowers die? *Annals of botany* **97**: 309-315.

- Sánchez, D. 2007. Embriología de *Mammillaria dioica* K. Brandege (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 52pp.
- Sanders, P., A. Bui, K. Weterings, K. McIntire, Y. Hsu, P. Lee, M. Truong, T. Beals y R. Goldberg. 1999. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod.* **11**: 297-322.
- Silva, J. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 61pp.
- Scheinvar, L. 2004. Flora cactológica del Estado de Querétaro. Diversidad y riqueza. FCE. México.
- Schnable P. y R. Wise. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci* **3** (5): 175-180.
- Shishkova, S. y Dubrovsky J. 2005. Developmental programmed cell death in primary rotos of Sonoran desert Cactaceae. *American Journal of Botany* **92** (9): 1590-1594.
- Strittmatter, L., V. Negrón-Ortiz. 2000. Floral dimorphism in two species of *Consolea* (Cactaceae): implications for mating system and taxonomy. Symposium: Flora of the Greater Antilles. The New York Botanical Garden. USA. Junio 2000.
- Strittmatter, L., V. Negrón-Ortiz y J. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* **89** (9): 1373-1387.
- Vacca, A., D. Valenti, A. Bobba, R. Merafina, S. Passarella, E. Marra. 2006. Cytochrome *c* is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in Tobacco bright-yellow 2 cells en route heat shock-induced cell death. *Plant Physiology.* **141**: 208-219.
- Valiente-Banuet, A., A. Rojas-Martínez, M. Arizmendi y P. Dávila. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *American Journal of Botany.* **84** (4): 452-455.
- Van Doorn, W., E. Woltering. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* **10** (3): 117- 122.

- Vianello A., M. Zancani, C. Peresson, E. Petrusa, V. Casolo, J. Krajnáková, S. Patui, E. Braidot y F. Macrí. 2007. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiologia Plantarum*. **129**: 242-252.
- Wu, H. y A. Cheung. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* **44**: 267-281.
- Yao, N., B. Eisfelder, J. Marvin y J. Greenberg. 2004. The mitochondrion- an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **40**: 596-610.

APÉNDICE I

PBS 1X

- 137 mM NaCl
- 1.47 mM KH_2PO_4
- 8.09 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 68 mM KCl 2

APÉNDICE II

Solución de Bloqueo (100 mL)

- 100 μL de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, GIBCO, No. Cat. 16000-36)
- 100 μL de PBS 10X (4°C)
- 800 μL de agua destilada estéril

APÉNDICE III

Solución de bloqueo con anticuerpo primario (1:500)

- 1 μL anticuerpo anti-porina anti-conejo policlonal (VDAC1/ Porin Antibody.Mitochondria loading control, abcam, No. Cat. ab15895)
- 1 μL anticuerpo citocromo *c* anti-ratón (Mouse Anti.Cytochrome *c*, BD Biosciences, No. Cat. 556432)
- 498 μL solución de solución de bloqueo

APÉNDICE IV

Solución de Bloqueo con anticuerpo secundario (1:200)

- 5 μL anticuerpo anti-conejo/Alexa 568 (Alexa Fluor 568 Goat anti-rabbit, Molecular Probes, No. Cat. LA-11011)
- 5 μL anticuerpo anti-ratón/FITC (Mouse immunoglobulins/FITC, DAKO, No. Cat. F031302)
- 990 μL solución de bloqueo