



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Embriología de la especie androdioica
Neobuxbaumia mezcalaensis (Bravo) Backeberg
(Cactaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

SAÚL GÓMEZ SÁNCHEZ

TUTORA

DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA



2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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:

Embriología de la especie androdioica *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeberg (Cactaceae)

realizado por **Gómez Sánchez Saúl** con número de cuenta **4-0001117-4** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

| | | |
|-----------------------|--------------------------------------|--|
| Propietario | Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán | |
| Propietario | Dr. Ángel Salvador Arias Montes | |
| Propietario Tutora | Dra. Sonia Vázquez Santana | |
| Suplente | M. en C. Gregorio Orozco Arroyo | |
| Suplente | Biól. Gabriel Olalde Parra | |

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 12 de mayo de 2010

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

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.

'nlm.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme todo y hacerme la persona que soy.

A la Facultad de Ciencias, que tanto tiempo me mantuvo entre sus pasillos, aulas y laboratorios.

A las profesoras del laboratorio de desarrollo en plantas: Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Clara Esquivel por su asesoría, consejos, críticas y apoyo siempre.

A las profesoras Dra. Ana Laura López Escamilla y la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, que fueron excelentes profesoras del taller de Estructuras reproductivas de la familia Cactaceae.

Al Dr. Salvador Arias Montes, ya que sin su asesoría y revisión, este trabajo estaría incompleto.

Al Biólogo Gabriel Olalde Parra, ya que sin sus clases no hubiera decidido a realizar mi trabajo con cactáceas.

Al M en C. Gregorio Orozco Arroyo por sus comentarios y amplio sentido crítico a este trabajo.

A la Bióloga Magali Espinosa Sánchez, ya que sin su ayuda, comentarios y apoyo no habría sido posible la finalización de este trabajo.



DEDICATORIAS

A **mis** padres, que gracias a su ayuda a lo largo de mi trayectoria académica entera, he terminado por fin una carrera universitaria; a mi **papá** que gracias a su **carácter** y su **manera** de ver el mundo, yo **también** tengo un modo distinto de ver el **mundo**. A mi **mamá** que gracias a su apoyo, sus cuidados, sus desvelos....en fin **TODO**, gracias mami.

A mis hermanos Marco y Adrián, que, no porque sean más jóvenes que yo, quiere decir que no **tenga** que aprender de **ustedes**. Y la verdad es que gracias a sus **comentarios** es que me **supero** todos los días.

A mi **familia** cercana, Mis abuelitos, mi tía Edith, mi tía Elizabeth, mis tíos José Luis y **Manuel** que, nos hemos distanciado **físicamente**, ya saben que así es la **vida**; pero sin su educación desde que era un bebé, no sería **la** persona que soy ahora. Los quiero mucho a todos.

A mis **amigos** Jorge, Carlos, Arturo, personas fundamentales en **mi** adolescencia, juntos fuimos deportistas, **amigos**, compañeros, y pues todo esto nos ha hecho personas de bien a los cuatro.

A Alde, Fer, Maga, ya que a pesar de los años y las **broncas**, nosotros cuatro nos hemos **mantenido** en contacto y nos hemos apoyado desde que nos conocemos. Gracias por sus **comentarios**, apoyo, y sana competencia, no **sólo** para la realización de esta tesis sino a lo **largo** de nuestras carreras.

A los compañeros del Laboratorio de **Desarrollo** en Plantas, algunos ya se han ido del **laboratorio** a otros lados, otros permanecen allí, pero de cualquier **modo** siempre tienen un consejo para dar, una **ayuda** que proporcionar o una sonrisa que compartir. Todos son excelentes personas.

A **Soni**, que desde un principio me dio **todo** el apoyo que un alumno necesita de su asesor, me adoptó cuando **venía** de una crisis en otro lado, me ha tenido toda la paciencia del mundo. Sin embargo hay algo que no se agradece, y eso es la amistad, Soni te quiero mucho.

A Gabriel y Bárbara, que para mí son un ejemplo a seguir, como personas, como pareja y como padres.

A **Maga**, antes que nada fuiste mi amiga, así pude conocerte y darme cuenta de la maravillosa **persona** que eres, gracias a ti he conocido muchos lugares, personas, cosas. Me has apoyado siempre, a lo largo de la carrera, para la realización de esta tesis, cuando tuve momentos **difíciles**. Siempre has sabido comprenderme y me has dado palabras de aliento. Todas esas cosas y más que no he mencionado, han **hecho** que me enamore de ti y **de verdad** que deseo que **estemos** juntos siempre. Te amo mi maléfica.



ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen. | 1 |
| Introducción. | 3 |
| Antecedentes | |
| Sistemas sexuales en angiospermas. | 5 |
| Sistemas sexuales en la familia Cactaceae. | 6 |
| Género <i>Neobuxbaumia</i> | 12 |
| <i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i> (Bravo) Backeb. | 12 |
| Objetivos. | 16 |
| Hipótesis. | 16 |
| Materiales y Métodos | |
| Área de estudio. | 17 |
| Colecta y fijación del material biológico. | 20 |
| Procesamiento del material. | 20 |
| Inclusión en Paraplast®. | 20 |
| Inclusión en resina LR-White. | 21 |
| Observación al microscopio electrónico de barrido. | 21 |
| Resultados | |
| Morfología floral. | 23 |
| Desarrollo del óvulo. | 32 |
| Desarrollo de anteras y granos de polen. | 36 |
| Discusión. | 41 |
| Conclusiones. | 43 |
| Literatura consultada. | 44 |

RESUMEN

Se analizaron plantas de tres localidades de la cactácea columnar *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeb. de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán. El sistema sexual de esta especie fue descrito anteriormente como androdioico, por presentar individuos con flores unisexuales masculinas e individuos con flores bisexuales; señalándose que las flores masculinas producen grandes cantidades de polen, pero con un gineceo reducido y sin óvulos maduros.

Sin embargo, después de estudiar el desarrollo embriológico de los dos supuestos morfos sexuales (masculinos y hermafroditas) mediante análisis histológico y morfológico, los hallazgos son interesantes y llevan al planteamiento de que la población estudiada de *N. mezcalaensis* no es androdioica sino hermafrodita, pero en la que algunas flores se ve afectada la función femenina por causa de algunos parásitos y/o herbívoros aún no determinados.

Esta aseveración se basa en que a pesar de que algunos individuos (supuestos masculinos) presentan reducción en el tamaño del ovario, atrofia temprana de algunos o la mayoría de sus los óvulos (sin alcanzar un desarrollo normal), los ovarios siempre se observaron parasitados; sin embargo, dentro de un mismo individuos hay ovarios, óvulos e incluso semillas que se desarrollan normalmente, lo que implica que la incapacidad de que los óvulos alcancen la madurez no es debido a un establecimiento genético de unisexualidad floral.

Los estigmas y estilos no se encuentran atrofiados e incluso son funcionales, y los granos de polen que llegan a los estigmas germinan, los tubos polínicos crecen a lo largo del estilo y al llegar al ovario y alcanzar a los óvulos funcionales, puede efectuarse la fecundación y formar algunas semillas. Sin embargo se requieren datos adicionales para conocer la proporción que cada individuo representa dentro de la población y si es el mismo patrón en cada localidad año tras año. Asimismo se desconoce la proporción de semillas que aportan a la población aquellos individuos que tienen afectada su función femenina y aquellos que no la tienen. También se observó que algunos ciclos reproductivos de *N. mezcalaensis* los daños que causan los parásitos es mayor.

Las flores de *N. mezcalaensis* son por lo tanto bisexuales. Tienen tanto el androceo como el gineceo funcionales, presentan un ovario con numerosos óvulos crasinucelados,

campilótopos, y bitégmicos, con un funículo largo, de células alargadas y papilosas en la epidermis ventral; el desarrollo del saco embrionario es monospórico, con la peculiaridad de que la primera división de la célula madre de la megaspora es longitudinal y la tétrada de megasporas es tetragonal, el saco embrionario maduro es octanucleado y heptacelular, con granos de almidón en la célula central, cerca del aparato oocelular. El estigma es multilobulado, con múltiples papilas estigmáticas; el estilo es hueco atípico, con células del canal que contiene taninos y con varios estratos subepidérmicos de tejido de transmisión por donde crecen los tubos polínicos.

Los estambres tienen un desarrollo sincrónico. Las anteras son bilobuladas y tetrasporangiadas. El desarrollo de la pared de la antera es de tipo monocotiledóneo, diferenciándose una epidermis, un endotecio con engrosamientos diferenciales en sus paredes celulares, una capa media efímera y un tapete secretor binucleado. Las tétradas de microsporas son tetraédricas y el grano de polen maduro es tricelular, tricolpado y con exina reticulada. La dehiscencia de la antera madura es longitudinal y extrorsa.



INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae comprende aproximadamente 2000 especies (Anderson, 2001) y es autóctona del Continente Americano, especialmente en las regiones áridas y semiáridas, pero también crecen en las zonas subtropicales y en las tropicales húmedas, donde algunas viven como epífitas. Actualmente muchas de sus especies se encuentran distribuidas desde Peace River, en el norte de Canadá, a una latitud de 59° N, hasta la Patagonia, en Argentina, a 52° de altitud Sur, y desde el nivel del mar, en las dunas costeras, hasta los 5100 m de latitud en Perú (Bravo-Hollis, 1978; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Anderson, 2001).

Arias (1993) estima que en Cactaceae el endemismo a nivel de géneros es de 35% y el de especies de 84%, mientras que Hernández y Godínez (1994) calculan que el grado de endemismos de las especies es del orden de 78% y del 73% a nivel de géneros; aunque las cifras difieren, ambos trabajos coinciden en que los endemismos en México es muy alto. La subfamilia Cactoideae es la que más especies tiene y comprende aproximadamente 110 géneros (Mandujano *et al.*, 2002).

México, por sus peculiares condiciones de climas, topografía y suelos, así como su posición geográfica, intermedia entre Norteamérica y Sudamérica, es un país con una gran diversidad biológica, ya que alberga, la mayor cantidad de especies de cactáceas. Debido a la diversidad y abundancia de especies en zonas áridas y semiáridas, así como la interacción con otras poblaciones de cactáceas y la dinámica de las comunidades vegetales en lugares secos, este tema es de gran interés científico (Rzedowski, 1978; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

Las cactáceas columnares incluyen alrededor de 170 especies, de las cuales 80 se encuentran en México. Estas plantas son componentes principales de los bosques tropicales caducifolios y matorrales xerófilos de las zonas áridas y semiáridas, que cubren cerca de dos tercios del territorio nacional (Casas, 2002).

De acuerdo con Bravo-Hollis (1978) y Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991), en la región mesoamericana de México se han registrado alrededor de 420 especies de cactáceas. De ellas, 22 especies son gigantes hasta 15 m de altura, con un crecimiento vegetativo lento, lo que implica que la floración la alcanzan después de varias décadas de vida. La mayoría de estas especies columnares no presentan propagación vegetativa ni son cultivadas (Casas *et al.*, 1999).

Neobuxbaumia mezcalaensis, fue descrita como una especie androdioica, ya que presenta plantas con flores bisexuales y plantas con flores masculinas. Las flores masculinas tienen anteras que producen grandes cantidades de granos de polen y el gineceo está completamente reducido y sin óvulos; mientras que las flores bisexuales presentan gineceo y androceo funcionales (Valiente-Banuet *et al.*, 1997).

El androdioicismo en Cactaceae está poco representado y dentro de las columnares, sólo *N. mezcalaensis* de la subfamilia Cactoideae ha sido descrita con este sistema sexual (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). La otra cactácea androdioica es la especie endémica de la isla caribeña de República Dominicana, *Pereskia quisqueyana*, perteneciente a la subfamilia Pereskioideae (Leuenberger, 1986).

Este estudio describe el desarrollo completo de las flores de *Neobuxbaumia mezcalaensis* para conocer los eventos que llevan a la esterilidad femenina de algunos individuos inicialmente descritos como masculinos, pero que al momento de la colecta del presente trabajo fue imposible su reconocimiento.



ANTECEDENTES

SISTEMAS SEXUALES EN ANGIOSPERMAS

La mayoría de las especies de angiospermas son hermafroditas, es decir presentan flores perfectas con estambres y carpelos, el porcentaje varía de 90% (Lebel-Hardenack y Grant, 1997) a 94% (Renner y Ricklefs, 1995). El resto de las especies (6-10%) está representado con sistemas sexuales monoicos, andromonoicos, ginomonoicos, trimonoicos, dioicos, ginodioicos, androdioicos e incluso trioicos (Fig. 1) (Charlesworth y Charlesworth, 1978; Bawa, 1980; Bawa y Beach, 1981; Barrett, 1998, 2002; Ainsworth, 2000).

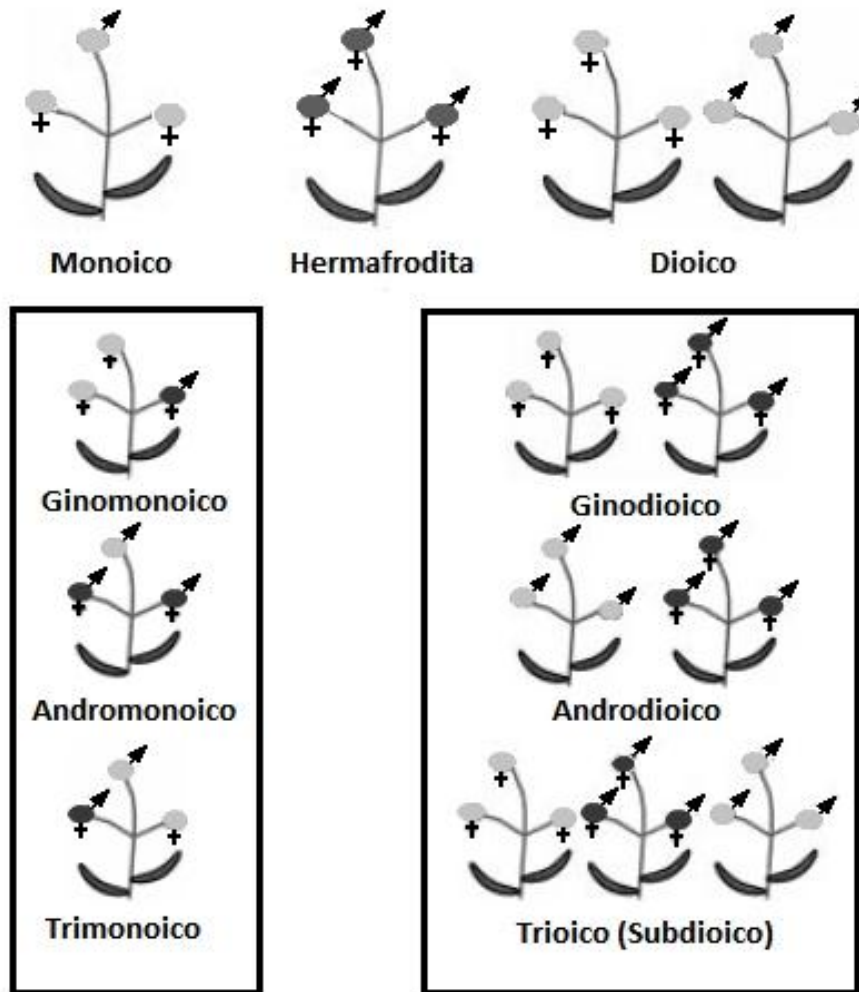


Figura 1. Sistemas sexuales en plantas (Tomado de Ainsworth, 2000).

Las especies de angiospermas que presentan flores unisexuales y sus formas mezcladas parecen estar distribuidas en todas las familias de angiospermas. Alrededor del 75% de las familias incluyen especies dioicas, sugiriendo eventos evolutivos independientes. En las primeras etapas del desarrollo de la mayoría de las flores de especies dioicas y monoicas no pueden distinguirse de las flores bisexuales, ya que los primordios de carpelos y estambres comienzan a desarrollarse en las flores que serán unisexuales y la aborción de un órgano ocurre posteriormente, variando la etapa de desarrollo entre especies (Lebel-Hardenack y Grant, 1997; Ainsworth, 2000). En otras especies monoicas y dioicas, las flores unisexuales no muestran evidencia del sexo opuesto debido a que nunca inicia el desarrollo del otro órgano sexual (Ainsworth, 2000).

SISTEMAS SEXUALES EN LA FAMILIA CACTACEAE

Las especies de la familia tienen un sistema de reproducción sexual predominantemente hermafrodita, al igual que la mayoría de las angiospermas en su flor coinciden los verticilos femenino y masculino, aunque raras veces por atrofia de los estambres o los pistilos, son unisexuales (Arreola, 1997).

Pero también se han reportado algunas especies de cactáceas que poseen un tipo diferente a la condición hermafrodita, como los sistemas dioicos, ginodioicos, androdioicos, trioicos y subdioicos.

La familia Cactaceae, está formada por tres subfamilias. La subfamilia Pereskioideae, comprende solo al género *Pereskia*, con 17 especies (Areces-Mallea, 1992), de las cuales, cuatro poseen flores unisexuales. Leuenberger (1986), reporta que existen flores masculinas en las especies *P. portulacifolia*, *P. quisqueyana* y *P. zinniflora*, mencionando que poseen lóculos de ovario reducidos, sin óvulos u óvulos anormales. Estas flores son aparentemente unisexuales con estilo corto y lóbulos estigmáticos filiformes sin papilas y en *P. quisqueyana* no se observan flores femeninas, por lo que aparentemente hay poblaciones androdioicas. Camacho (2009)

describió el desarrollo de las flores masculinas de *P. portulacifolia*, demostrando que las placentas de las flores masculinas se atrofian tempranamente sin que los óvulos se inicien y el estilo y estigma son reducidos. Areces-Mallea (1992) reporta a *Pereskia marcanoi* como una especie dioica, en la flor femenina se observan estambres estériles y un ovario con numerosos óvulos viables, mientras que las flores masculinas tienen numerosos estambres viables y ovario con algunos óvulos anormales.

Dentro de la subfamilia Opuntioideae, *Opuntia stenopetala*, presenta plantas con flores femeninas y plantas con flores masculinas, por lo que posee un sistema reproductor dioico. Las flores femeninas presentan estambres cortos, con anteras colapsadas, indehiscentes y sin polen, el desarrollo de la antera se detiene en etapa de célula madre de las microsporas (Orozco, 2002), sin llegar a meiosis, por lo que entran a muerte celular programada (Flores, 2005). Mientras que el gineceo tiene estigma, estilo y un ovario con óvulos viables (Orozco, 2002). En las flores masculinas los estambres son largos, las anteras dehiscentes con granos de polen funcionales y se encuentran estilodios que no desarrollan lóbulos estigmáticos; el ovario es reducido y presenta tres fenotipos: (1) ovario reducido con óvulos únicamente en la base, anormales y atrofiados, (2) ovario sin óvulos, y (3) sin cavidad del ovario (Orozco, 2002; 2005).

Opuntia robusta, presenta poblaciones hermafroditas, dioicas o trioicas. En las flores bisexuales de las poblaciones hermafroditas y trioicas, tanto el androceo como el gineceo son funcionales. Las anteras de las flores masculinas en las poblaciones trioicas y dioicas producen grandes cantidades de granos de polen (Del Castillo, 1986). El gineceo tiene un estilo que termina en un estigma con lóbulos reducidos pero funcionales y el ovario puede estar completamente vacío o presentar pocos óvulos pero anormales (Silva, 2007; Hernández, 2008). En el caso de las flores femeninas las anteras no producen polen porque entran a un proceso de muerte celular programada durante la meiosis de las células madres de las microsporas (Alfaro, 2008).

Rebman (1998) menciona que *Cylindropuntia sanfelipensis* posee un sistema reproductor ginodioico. Las flores femeninas presentan estambres cortos y anteras colapsadas (no producen granos de polen), el estilo sobresale de las anteras y posee numerosos lóbulos estigmáticos y un ovario con numerosos óvulos. Mientras que en la flor bisexual tanto el gineceo como el androceo son funcionales. También él menciona que *C. wolffi* presenta el mismo tipo de sistema sexual que *C. sanfelipensis*.

También existen sistemas asexuales en cactáceas, como en algunas especies del género *Opuntia*, donde se desarrollan embriones adventicios a partir de tejido nucelar (Vélez y Rodríguez, 1996; Mondragón, 2001), o como en *O. streptacantha*, donde los embriones se desarrollan desde un óvulo no fertilizado. Las flores de *O. streptacantha* que han sido emasculadas y aisladas de polinizadores exógenos producen frutos con semilla. Esto ha sido interpretado como evidencia de apomixis (Trujillo y González, 1991; Pimienta y Ramírez, 1999).

Consolea millspaughii tiene un sistema sexual dioico por presentar individuos masculinos y femeninos. Las flores masculinas contienen óvulos abortados, mientras que en las flores femeninas no hay presencia de polen en las anteras (Strittmatter *et al.*, 2006).

En *Consolea moniliformis*, *C. rubescens*, *C. picardae* y *C. nashii* han reportado la presencia de flores unisexuales, asumiendo un sistema sexual dioico. Las flores masculinas presentan óvulos abortados y las flores femeninas no presentan granos de polen y el tapete se hipertrofia (Strittmatter *et al.*, 2006).

Consolea spinosissima, posee un sistema reproductor subdioico, con tres morfos florales (femenino y masculino, aunque el bisexual poco representado). En los primeros estadios de las flores femeninas las anteras se desarrollan similarmente a las de las flores masculinas. El tapete de las flores femeninas se degrada previo a la meiosis y las células madres de las microsporas casi siempre degeneran en la Profase 1. Durante la antesis las anteras de las flores femeninas están vacías, colapsadas y se encuentran por debajo del nivel del estigma, el estilo es robusto,

con lóbulos del estigma divergentes y ovario con óvulos bien desarrollados. Las flores masculinas poseen estambres largos, con anteras dehiscentes y polen viable; el ovario, estilo y estigma están bien desarrollados, sin embargo, los lóbulos del estigma permanecen cerrados; el ovario contiene numerosos óvulos, que se colapsan y permanecen así hasta la antesis. Hay una reducción considerable en el tejido nucelar, debido a la desintegración de las células nucleares que rodean al saco embrionario (Strittmatter *et al.*, 2002).

Rebman y Pinkava (2001) reportan que *Cylindropuntia molesta* y *C. calmalliana* presentan un sistema reproductor ginodioico, aunque no se mencionan los detalles de la organización floral de cada una de ellas, y posiblemente *C. calmalliana* sea una sinonimia de *C. molesta* (Bravo-Hollis, 1978).

Ya en la subfamilia Cactoideae, Ganders y Kennedy (1978) reportan flores bisexuales y femeninas de *Mammillaria dioica*, ambas con producción de semillas aparentemente normales. Sin embargo, no describen a las flores femeninas y bisexuales. Sánchez (2007) estudió una población de *M. dioica* en Baja California Sur, encontrando dos morfos florales, el bisexual y el femenino, por lo que esta población es ginodioica. La flor bisexual, al igual que la femenina, presenta un ovario con numerosos óvulos morfológicamente bien formados; el estilo y estigma están bien desarrollados; los estambres producen una gran cantidad de granos de polen viables. En la flor femenina, las anteras se atrofian al iniciarse la meiosis de las células madres de las microsporas y en consecuencia no se forman granos de polen. El tapete muestra un desarrollo anormal, es biestratificado y el estrato interno desarrolla engrosamientos fibrosos en sus paredes celulares semejantes a las del endotecio. Ya en etapa de antesis, las anteras se observan completamente colapsadas.

Hoffman (1992) reporta que *Echinocereus coccineus* presenta individuos con flores masculinas e individuos con flores femeninas, por lo tanto es una especie dioica. Las flores femeninas poseen aparentemente partes femeninas y masculinas. En las flores femeninas existen ovarios, estilos, estigmas y óvulos bien formados, estas flores producen frutos, pero los

filamentos son más cortos y las anteras son más pequeñas, están colapsadas y no producen polen. Las flores masculinas poseen ovario, estilo, estigma y óvulos bien formados, pero no son funcionales ya que no producen frutos; los estambres tienen anteras que producen polen viable.

Echinocereus yavapaiensis posee un sistema sexual dioico, en el cual las flores masculinas no producen frutos, el estigma y la cavidad del ovario se encuentran reducidos en comparación con las flores femeninas, de las cuales solo se mencionan que son estériles masculinas (Baker, 2006). Rebman 2003 (en Baker, 2006) propone que *Echinocereus monbergerianus* posee un sistema sexual trioico, pero no se ha desarrollado un estudio en particular en ella.

Fleming *et al.*, (1994) reportaron poblaciones trioicas y ginodioicas de *Pachycereus pringlei*. Las flores masculinas tienen anteras que producen grandes cantidades de granos de polen; el estilo y estigma totalmente desarrollado, pero el ovario usualmente carece de óvulos y en lugar hay sólo masas de tejido funicular, en ocasiones algunos individuos presentan un pequeño número de óvulos, los cuales a pesar de iniciar su desarrollo a semilla, estas nunca alcanzan la madurez. En las flores femeninas las anteras carecen de polen, es más pequeña que la bisexual, pero sí hay producción de frutos. En las flores bisexuales tanto el gineceo y androceo son funcionales (Núñez, 2004).

Kimnach (1982) propone que *Selenicereus innesii* posee un sistema reproductor ginodioico. En el caso de las flores femeninas carecen absolutamente de estambres y el ovario contiene pocos óvulos; estilo rudimentario que terminan en papilas estigmáticas. En las flores bisexuales tanto el gineceo y el androceo son funcionales.

Respecto a *Neobuxbaumia mezcalaensis*, se ha reportado que es una especie androdioica, ya que presenta individuos con flores bisexuales e individuos con flores masculinas. Las flores masculinas fueron reportadas con grandes cantidades de granos de polen y el gineceo está completamente reducido sin óvulos maduros. Las flores bisexuales fueron reportadas con gineceo y androceo funcionales. Los granos de polen producidos por ambos tipos florales,

forman tubos polínicos, por lo que concluyen que ambos son funcionales. (Valiente-Banuet *et al.*, 1997).

El androdioicismo es un sistema de reproducción compuesto por individuos hermafroditas e individuos masculinos. Esta condición es extremadamente rara en las angiospermas y en teoría, el androdioicismo podría ser un paso intermedio entre el hermafroditismo y el dioicismo, pero no existen casos claros que evidencien este evento (Weiblen *et al.*, 2000). Varias de las especies de plantas que han sido descritas como androdioicas en su morfología, han sido finalmente reveladas como funcionalmente dioicas (dioicismo críptico), ya que el polen de los individuos morfológicamente hermafroditas es estéril, o bien se forman anteras pero sin polen, cumpliendo únicamente con la función femenina (estériles masculinas), por ejemplo, los granos de polen de flores aparentemente bisexuales, carecen de citoplasma en *Decaspermum parviflorum* (Akimoto *et al.*, 1999) o no tienen aperturas en *Saurauia veraguensis* (Haber y Bawa, 1984).

En estudios teóricos previos se ha tratado de explicar la rareza del androdioicismo en la naturaleza. Dado que los individuos masculinos en las especies androdioicas sólo contribuyen a las siguientes generaciones a través del polen, éste debe producirse en gran número para compensar la carencia de la función femenina. La evolución del androdioicismo requiere que el polen de los individuos masculinos tenga al menos el doble del éxito del polen de los individuos hermafroditas, haciendo más fácil que los individuos masculinos invadan una población hermafrodita, donde a su vez la feminización de los individuos hermafroditas es más frecuente (Akimoto *et al.*, 1999).

El androdioicismo podría ser un paso intermedio en la formación del dioicismo desde el hermafroditismo (Rieseberg *et al.*, 1992). No obstante, diversos factores sugieren que el androdioicismo rara vez se ha visto involucrado en la evolución del dioicismo, ya que este sistema es muy raro en la naturaleza. Charlesworth (1984 en Rieseberg *et al.*, 1992), cuestiona si el androdioicismo funcional existe. Ella nota que en todas las especies mencionadas inicialmente

como androdioicas, al ser estudiadas en detalle, son funcionalmente dioicas y por lo tanto plantea que el androdioicismo es una correcta descripción de sólo características morfológicas, ya que es común que las plantas con morfología floral hermafrodita sean funcionalmente femeninas, debido a que el polen no es viable. En muchos de esos casos, la proporción sexual fue reportada como 1:1, en observaciones que fuertemente sugieren dioicismo (Rieseberg *et al.*, 1992).

Género *Neobuxbaumia*

Neobuxbaumia Backeb. Es un género que incluye 8 especies de plantas columnares solitarias o ramificadas, de entre 7 y 15 m. de altura. Con costillas numerosas, de 14 a 30 (pero en *N. euphorbioides* sólo de 8 a 10). Aréolas distantes 1 a 2.5 cm. entre sí. Algunas especies forman un pseudocefalio (*N. scoparia* y *N. euphorbioides*). Flores cilíndrico-campanuladas, de 5 cm. de longitud, dispuestas a lo largo de toda la costilla o apicales y subapicales, nocturnas o nocturno-matutinas, polinizadas por murciélagos. El Pericarpelo con podarios prominentes, pequeños, provistos de nectarios extraflorales. Cámara nectarial amplia, semicerrada por la base de los estambres primarios o por una membrana. Fruto verdoso a rojo, recubierto de podarios, con dehiscencia irregular, pulpa blanca, carnosa, pero no jugosa. Semillas brillantes y negras (Scheinvar, 2004). La distribución de las 8 especies es desde el sur de Tamaulipas hasta la mitad norte de Veracruz y en la vertiente del Pacífico, desde el sur de Jalisco, Colima, Guerrero, Puebla y hasta Oaxaca (Scheinvar, 2004). El género *Neobuxbaumia* es utilizado como alimento (flores y frutos) y los tallos como madera para techar casas (Luna y Aguirre, 2001).

***Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeb.**

Son plantas columnares y solitarias, que en estado adulto alcanzan hasta los 14 m de alto. Sus tallos son verdes a ligeramente amarillentos, de 13 a 40 centímetros de diámetro. Presentan de 13 a 25 costillas (Valiente-Banuet *et al.*, 1997; Ruedas, 2003). Rara vez se ramifican (Bravo-Hollis, 1978) y cuando ramifican, lo hacen de la parte inferior del tallo. La zona fértil se

localiza a lo largo de todo el tallo (Ruedas, 2003). Las aréolas de 5 a 6 mm de largo, con espinas radiales y centrales de color pardo claro y gris. Presenta de 1 a 4 espinas centrales un poco más largas que las radiales. Espinas radiales de 5 a 9 desde 0.8 - 2 cm de largo y presenta las puntas oscuras (Anderson, 2001).

Las flores de *N. mezcalaensis* son de antesis nocturno-matutina, son de color blanco a verde-rojizas y miden de 5 a 5.5 cm de largo, son tubular-infundibuliformes. A diferencia de las otras dos especies de este género, que presentan sus flores en la zona apical, esta especie florece a lo largo de todo del tallo (Fig. 2A, B).

Los tubos florales y los pericarpelos presentan podarios con pequeñas escamas y lana. Los estambres miden de 0.5 a 1 cm de largo y tiene filamentos de color amarillo verdoso a rosa. Esta especie presenta un sistema reproductivo de tipo androdioico, con flores masculinas y flores hermafroditas en distintas plantas. Los individuos masculinos tienen gineceo completamente reducido sin óvulos maduros y no producen frutos. Los granos de polen producidos por ambos tipos florales, forman tubos polínicos, por lo que concluyen que ambos son funcionalmente viables. Sus frutos son verdes y miden de 3 a 4 cm de largo, de forma globosa a ovoide, tienen areolas con fieltro y espinas de 3 a 6 cm de largo (Fig. 2C).



Figura 2. Plantas de *Neobuxbaumia mezcalaensis* **A.** Individuo presumiblemente masculino en etapa reproductiva mostrando botones florales y algunos frutos abortivos (flechas). **B** Individuo hermafrodita mostrando a los botones florales creciendo a lo largo de las costillas y un fruto en desarrollo (flecha). **C.** Frutos en desarrollo de individuo hermafrodita

Esta especie florece entre marzo y mayo y fructifica entre mayo y junio. Sus semillas son negras. Miden de 2.5 a 3 mm de largo y pesan en promedio 6.0 mg. *N. mezcalaensis* produce flores nocturnas quiropterófilas, visitada por varias especies de murciélagos nectarívoros entre los que se encuentran *Leptonycteris curasoae*, *L. nivalis*, *Choeronycteris mexicana*; el colibrí oscuro *Cynanthus sordidus*; y también insectos como *Eumorpha anchemola*, *Apis mellifera* y *Trigona sp.* (Valiente-Banuet, 2002).

Neobuxbaumia mezcalaensis no se encuentra en los listados de la NOM-059-SEMARNAT, de especies protegidas, amenazadas o sujetas a protección especial (SEMARNAT, 2002). Tampoco se encuentra en ninguno de los tres apéndices de la convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES, 2008).

Esta investigación pretende demostrar embriológicamente si en realidad *N. mezcalaensis* es una especie androdioica, ya que esto aumentaría la información sobre el desarrollo de flores unisexuales masculinas de especies androdioicas, ya que es uno de los sistemas reproductivos más raros y poco conocidos en las angiospermas y en particular en la familia Cactaceae.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir la embriología de la especie androdioica *Neobuxbaumia mezcalaensis* de la Reserva de la Biosfera Tehuacán–Cuicatlán.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir la microsporogénesis y la microgametogénesis en las flores de *N. mezcalaensis*.
2. Describir el desarrollo del gineceo, incluyendo la megasporogénesis y megagametogénesis en las flores de *N. mezcalaensis*.

HIPÓTESIS

Al igual que otras especies de cactáceas con flores unisexuales, el desarrollo de todos los morfos florales comienza siendo bisexual y en alguna etapa del desarrollo, uno de los morfos florales presenta atrofia de uno de los verticilos sexuales, en este caso las flores de *N. mezcalaensis* que presentan óvulos abortivos y ovarios reducidos puede ser atribuida a esterilidad femenina que la lleva a ser una especie androdioica.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

Se trabajó en tres localidades de *Neobuxbaumia mezcalaensis* dentro de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Las tres localidades muestreadas se ubican dentro de las siguientes coordenadas: 18°14'37.4"N, 97°33'63.6"O (Fig. 3); 18°16'57.3"N, 97°32'16.0"O (Fig. 4A); y 18°14'19.5"N, 97°33'44.4"O (Fig. 4B).



Figura 3. Primera localidad muestreada. Se encuentra entre los límites de los municipios de Zapotitlán Salinas y Acatepec, Puebla.

La Reserva de la Biósfera Tehuacán–Cuicatlán (Fig. 5), ocupa una superficie de 485 Km², con coordenadas geográficas generales de 18°14' N y 97°33' W. Limita al norte con Tehuacán; al este, con San Gabriel Chilac, San José Mihuatlán y Altepexi; al Sur con Caltepec; y al Oeste con Atexcal y el estado de Oaxaca (DGP–SCT, 2008). La temperatura media anual de alrededor de 21°C, y una precipitación media anual de 400 a 450 mm (Paredes *et al.*, 2007).



Figura 4. A. Segunda localidad muestreada, cercana a la Colonia San Martín, dentro del municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla. B. Tercera localidad muestreada. Agua “El Burro”, municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Las comunidades vegetales localizadas en la región de Zapotitlán son el mezquital o selva baja perennifolia con espinas laterales (con prevalencia de *Prosopis laevigata*); el matorral espinoso (con *Mimosa luisana*, *Acacia farnesiana*, *Cordia curassavica* y *Fouquieria farinosa*); la tetechera (asociación con abundancia de *Neobuxbaumia tetetzo*), el cardonal (en el que destaca *Cephalocereus columna-trajani*); el izotal (matorral con *Yucca periculosa*) el chaparral o mexical (con *Brahea nitida* y *Dasyllirion serratifolium*) la tetechera-candelillar (con *Neobuxbaumia tetetzo* y *Euphorbia antisiphilitica*), la selva baja caducifolia (con *Myrtillocactus geometrizans*, *Bursera schlechtendalii* y *Bursera aptera*) (Casas, 1999).

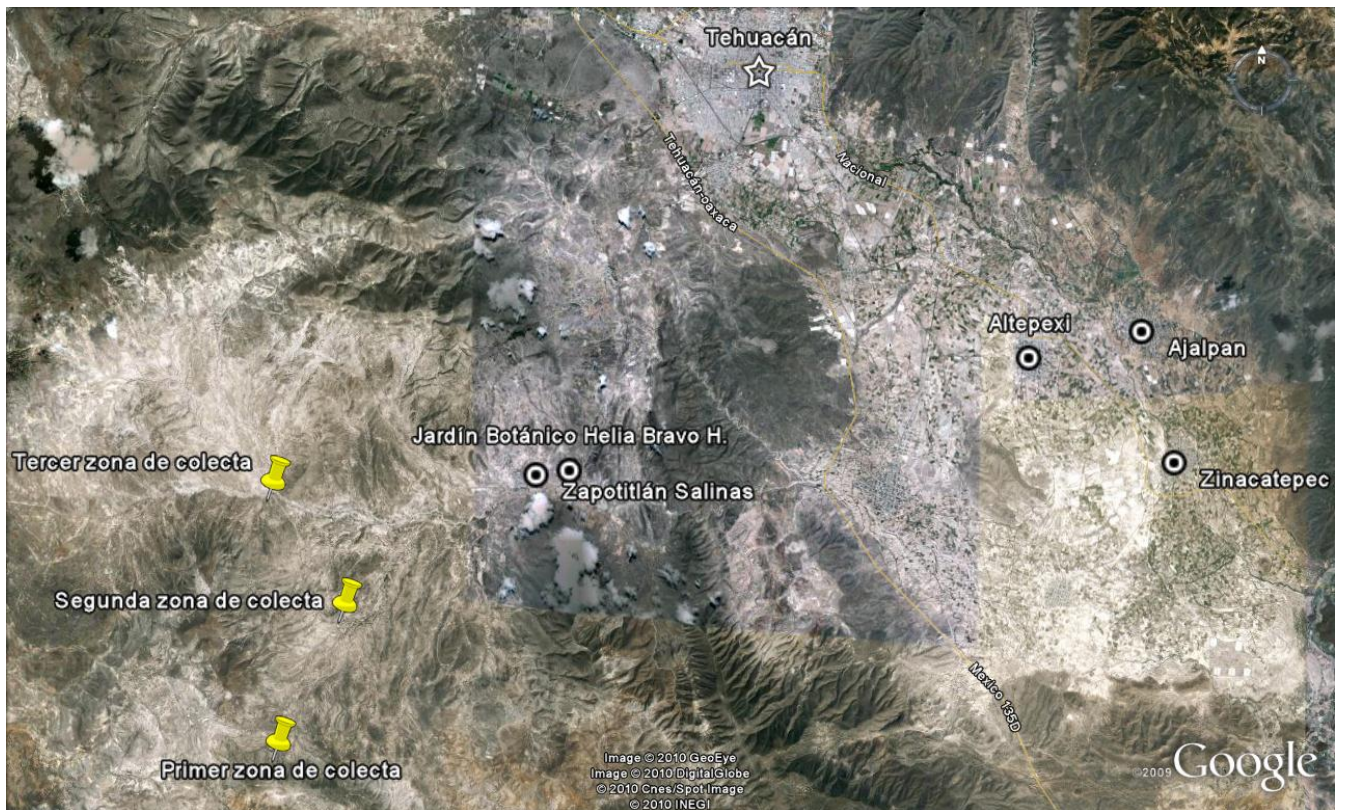


Figura 5. Mapa que muestra las localidades donde *Neobuxbaumia mezcalaensis* fue muestreada. (Google Earth, 2010).

COLECTA Y FIJACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizó la colecta de los botones florales y flores en antesis de diversos individuos masculinos y hermafroditas de *Neobuxbaumia mezcalaensis*, en tres visitas al campo, la primera, en el mes de junio de 2007, la segunda en abril del 2008 y la tercera en mayo de 2010. Se disectaron de una a tres flores de cada individuo en el campo, de forma longitudinal para determinar el sexo de las plantas, de acuerdo a la presencia/ausencia de óvulos y la apariencia del ovario (ovario reducido con pocos óvulos/ovario con grande y con muchos óvulos) y con base en estas observaciones se determinó a los individuos como masculinos o hermafroditas respectivamente. Después se procedió a su fijación en FAA.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL

Los botones florales se separaron de acuerdo a su tamaño, y se establecieron diferentes etapas de desarrollo. Las muestras se lavaron con agua y se deshidrataron en etanoles graduales (50%, 70%, 85%, 96%, 100% y 100%). Cada cambio se realizó cada tres minutos. Una parte del material se incluyó en Paraplast® y en resina LR – White, y la otra parte se preparó para ser observada en el microscopio electrónico de barrido.

INCLUSIÓN EN PARAPLAST

Para incluir en Paraplast®, el material fue procesado inicialmente en Citrosolv® (sustituto de xilol) por tres horas y posteriormente en mezclas Paraplast®: xilol en proporciones 1: 1 y 2: 1 durante 12 y 25 horas respectivamente, dentro de una estufa a 56°C aproximadamente. Posteriormente se impregnaron con Paraplast® puro durante 72 horas y se incluyeron en moldes metálicos. Se obtuvieron cortes de 10 µm de grosor en un

micrótomo de rotación, posteriormente se desparafinaron durante 25 minutos, se pasaron por tres cambios de Citrosolv® y se hidrataron hasta etanol 96% durante tres minutos cada uno, se tiñeron con safranina – verde rápido en metilcelosolve.

INCLUSIÓN EN RESINA LR – WHITE

Posterior a la deshidratación etanólica gradual de los tejidos, éstos se colocan en una mezcla de LR – White: etanol 100%, 1:1, durante dos horas. Posteriormente se incluyeron en LR – White puro realizando dos cambios durante 12 horas cada cambio. Las muestras se orientaron en cápsulas de gelatina para llevar a cabo la polimerización en una estufa a 55 °C en ausencia de oxígeno. Se realizaron cortes de 1 a 2 µm de grosor en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina. Posteriormente se observaron por microscopía de luz y se tomaron las fotomicrografías correspondientes.

OBSERVACION AL MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

Se seleccionaron algunos botones florales y flores en anthesis del material fijado en FAA y se disectaron total o parcialmente removiendo partes del perianto. Este material se deshidrató en etanol al 100%, para posteriormente desecarlo a punto crítico con CO₂. Se cubrieron en una fina capa de oro en una ionizadora y posteriormente, se montó en un portamuestras de aluminio con una cinta conductiva de carbón, después se observaron en los microscopios electrónicos de barrido Jeol JSM-5310LV o Hitachi S-2460N. La metodología utilizada se resume en el diagrama de flujo de la figura 6.

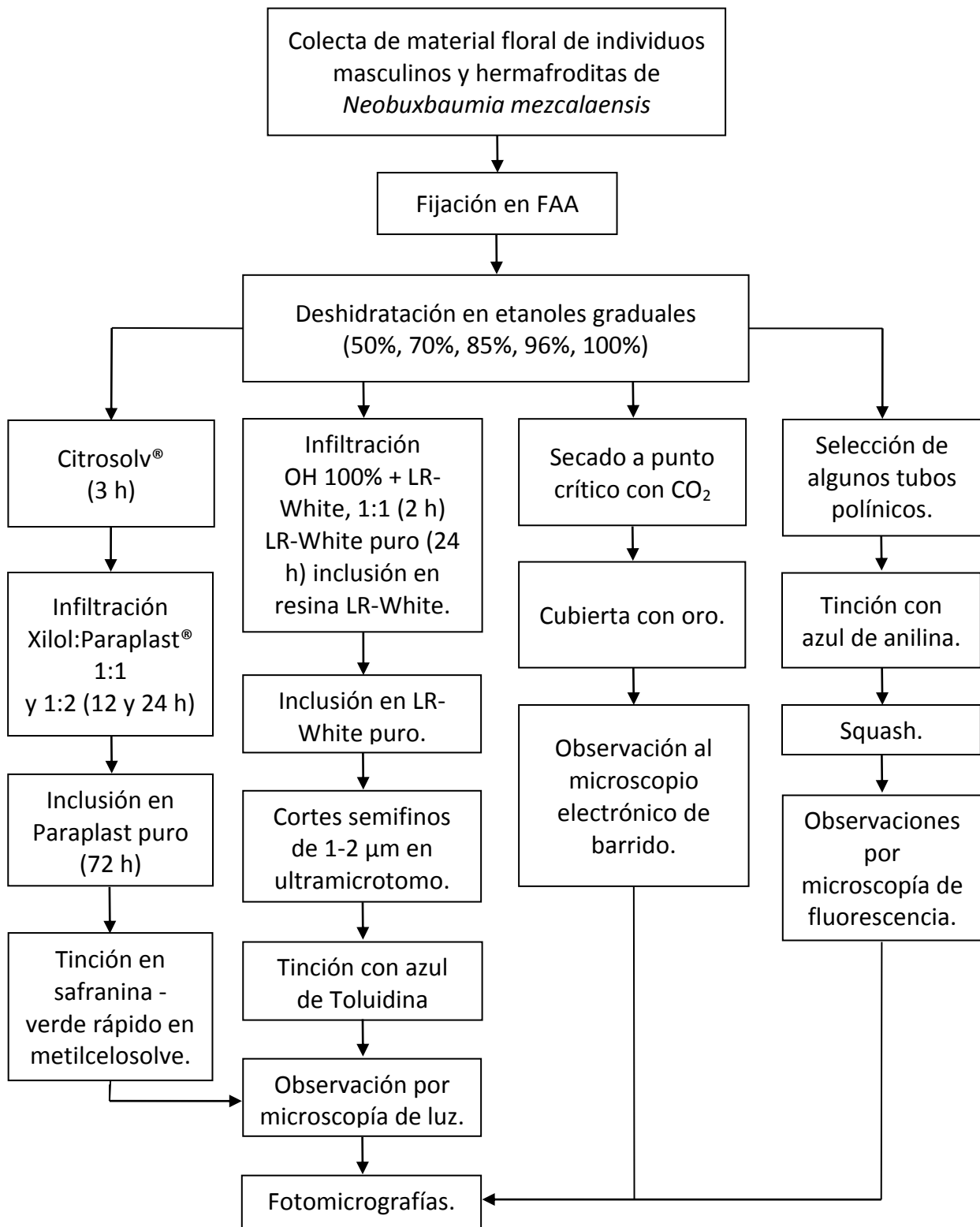


Figura 6. Diagrama de flujo que resume la metodología utilizada.

RESULTADOS

Morfología y anatomía floral

El análisis de resultados permitió reconocer que *N. mezcalaensis* no es androdioica. Se describirá indistintamente la embriología de *N. mezcalaensis* haciendo énfasis en el hecho de que existen algunas flores que presentan esterilidad femenina sin que esto defina individuos completamente masculinos.

Las flores en antesis son de forma infundibuliforme, poseen un pericarpelo desarrollado y abundantes estambres. Los estambres tienen anteras que abren cerca del anochecer. Al inicio de la antesis los lóbulos del estigma permanecen cerrados (Fig. 7A), pero posteriormente los estigmas extienden sus lóbulos para que el polen de otras flores pueda ser depositado en ellas. La antesis dura hasta la mañana del día siguiente (Fig. 7B), pero la mayor parte del polen es removido durante la noche, el polen que queda es aprovechado a la mañana siguiente por otros visitantes secundarios (Fig. 8A).



Figura 7. Individuos de *Neobuxbaumia mezcalaensis*. **A.** Tallo con flores en diferentes etapas de desarrollo, la flor central en antesis nocturna. Las anteras (flechas negras) están abiertas pero los lóbulos estigmáticos (flecha roja) aún no se extienden cuando las anteras ya abrieron. **B.** Flor en antesis a la mañana siguiente de su polinización, permaneciendo abierta algunas horas de la mañana, pero sus lóbulos estigmáticos polinizados se han cerrado y las anteras ya casi no tienen polen.

El androceo está formado por estambres de filamentos largos, los cuales se insertan en la parte interna de los tépalos. En la base de la inserción de los filamentos y cercanos a la parte superior del ovario se encuentra una cámara nectarial formada de varios estratos de tejido secretor. La pared del ovario tiene grandes células de mucílago y contiene múltiples óvulos. El estilo es largo y el estigma multilobulado (Figs. 8B, 9A). Sólo hasta el momento de la disección de las flores se observa el ovario reducido en las flores aparentemente masculinas (Fig. 8C).

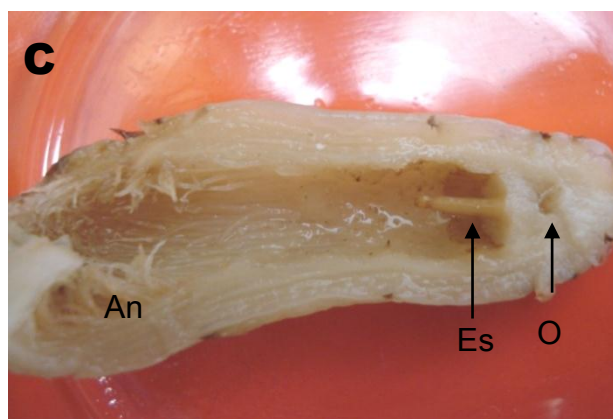
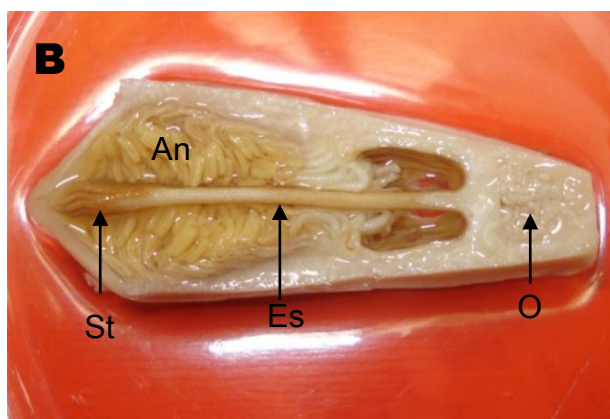


Figura 8. Flores de *Neobuxbaumia mezcalaensis*. **A.** Flor en antesis con abejas (flecha) como visitantes florales en las mañanas. **B.** Flor bisexual con Anteras, ovario, estilo y estigma bien desarrollados. **C.** Flor en antesis mostrando las anteras, el estigma y parte del estilo removidos por herbívoros. **An**, anteras; **Es**, estilo; **O**, ovario; **St**, Estigma.

El estilo es de tipo hueco, termina en un estigma que contiene generalmente siete lóbulos estigmáticos (Fig. 9B); cuya epidermis se modifica en largas papilas estigmáticas, algunas de las cuales contienen taninos. Las papilas rodean a un tejido de transmisión de varios estratos celulares en forma de V, separado en el margen de cada carpelo y fusionado en la parte abaxial de cada uno de éstos (Figs. 9B-C). En el centro de cada lóbulo estigmático se observa un haz vascular (Fig. 9C).

El tejido de transmisión que aparece desde el ápice de las papilas estigmáticas en forma de V se extiende hasta la base del estigma, en donde forma un anillo continuo (Fig. 9E). La base de cada lóbulo estigmático está situada en cada haz vascular concéntrico, de tal manera que el tejido de transmisión presente a este nivel en el margen de cada carpelo, se fusiona formando un radio de tejido de transmisión que corresponde a la unión de los dos márgenes de cada carpelo (Figs. 9E-F). A este nivel, comienza a delimitarse un estilo de forma cilíndrica, cuya epidermis externa se distingue por la presencia de células epidérmicas con taninos, un córtex de varios estratos, en el cual se encuentra un anillo discontinuo de haces vasculares, el anillo continuo del tejido de transmisión y una epidermis interna modificada en células de apariencia papilar (semejantes a las del estigma), algunas de ellas con taninos, al igual que las de los lóbulos estigmáticos (Fig. 9G).

A nivel medio del estilo y observando cortes transversales de éste se observa un estilo con epidermis sinuosa y en general todos los tejidos tienen la misma disposición y apariencia, la epidermis externa con taninos delimita al córtex que contiene a los haces vasculares y algunas células grandes de mucílago. Hacia el centro del estilo, un anillo continuo de tejido de transmisión de varios estratos de células de apariencia secretora y en el centro una epidermis interna, que a este nivel no se diferencian en papilas alargadas y algunas tienen taninos (Figs. 9H-I). La luz del canal es de menor diámetro (Figs. 9I-J).

En la base del estilo la luz del canal estilar se reduce, ya no hay una diferenciación de epidermis interna, el tejido de transmisión cierra la luz del canal, el córtex tiene un mayor número de estratos celulares y de células de mucílago (Figs. 9K-M).

El ovario es la estructura que se ve principalmente afectada por los herbívoros que parasitan a *N. mezcalaensis*. La mayoría de los ovarios analizados son de mayor tamaño y tienen numerosos óvulos (Fig. 9N). Sólo escasos individuos presentaron ovarios reducidos y con un número de óvulos menor con respecto al de la mayoría los individuos (Fig. 9O), algunas veces esos óvulos no alcanzan el desarrollo normal.

Antes de que los lóbulos estigmáticos se extiendan, sus márgenes se observan doblados hacia atrás (hacia el lado abaxial de cada carpelo). Las anteras son fértiles y forman granos de polen. Éstas se ubican por abajo del nivel del estigma (Fig. 10A). Las papilas estigmáticas son alargadas y redondeadas (Fig. 10B). En la base de los filamentos de los estambres se observa la cámara nectarial, cerca de la inserción del estilo en el ovario (Fig. 10C). El nectario tiene estomas que permiten la liberación de néctar, e incluso de algunos cristales poligonales (Fig. 10D). El ovario tiene numerosos óvulos implantados en los márgenes de los carpelos (placentación parietal) (Fig. 10E). Los óvulos tienen un funículo con tricomas alargados en la epidermis ventral (Fig. 10F).

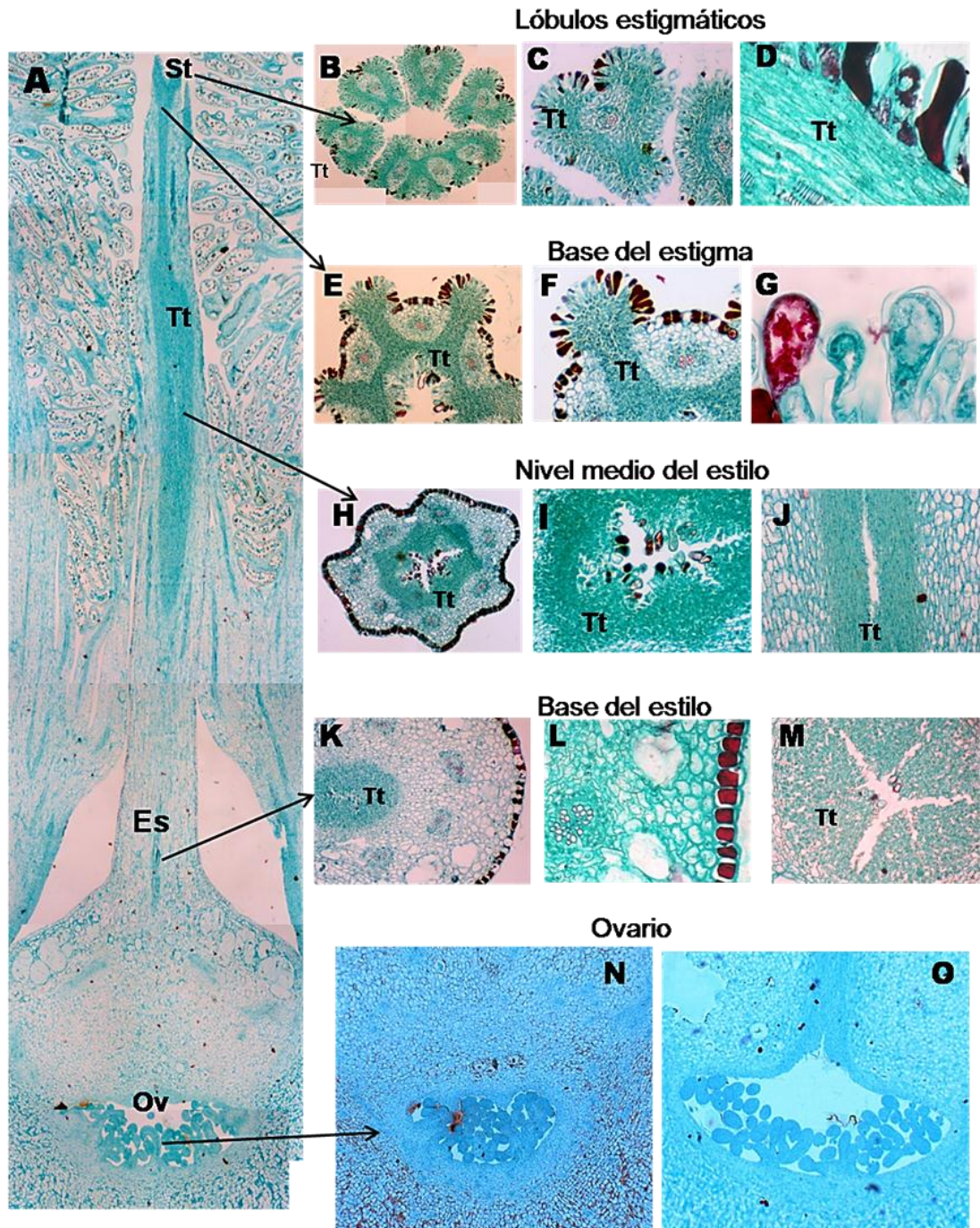


Figura 9. Anatomía de la flor de *N. mezcalaensis*. **A.** Flor con androceo y gineceo. **B.** Corte transversal de lóbulos estigmáticos. **C.** Acercamiento a un lóbulo estigmático. **D.** Corte longitudinal de papilas estigmáticas y tejido de transmisión adyacente. **E.** Corte transversal de la base del estigma. **F.** Acercamiento a la fusión de los márgenes de dos carpelos. **G.** Acercamiento a las papilas estigmáticas. **H.** Corte transversal del estilo a nivel medio. **I.** Acercamiento al canal estilar y al tejido de transmisión. **J.** Corte longitudinal de una sección del canal estilar, del tejido de transmisión y del córtex. **K.** Corte transversal de la base del estilo. **L.** Acercamiento a la epidermis externa, córtex y un haz vascular. **M.** Acercamiento al canal casi cerrado por el tejido de transmisión. **N.** Ovario reducido en antesis. **O.** Ovario con óvulos en desarrollo. **Cn**, cámara nectarial; **Es**, estilo; **Ov**, ovario; **St**, estigma; **Tt**, tejido de transmisión.

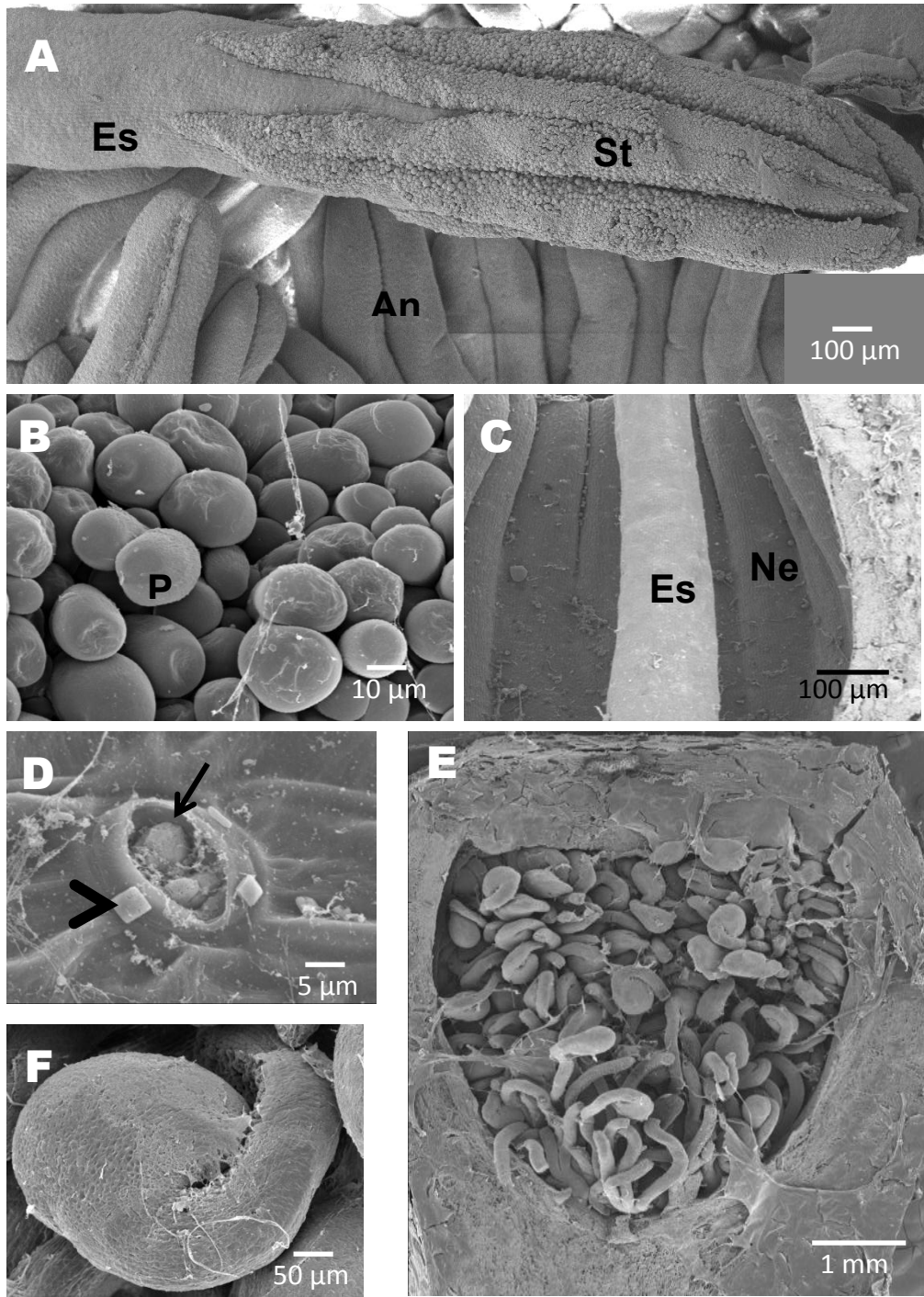


Figura 10. Fotografías al microscopio electrónico de barrido de las flores bisexuales de *N. mezcalaensis*. **A.** El estigma y estilo antes de que los lóbulos estigmáticos se extiendan. Las anteras son tetrasporangiadas. **B.** Acercamiento a las papilas estigmáticas alargadas y redondeadas en su ápice. **C.** Cavidad nectarial y zona de inserción de los filamentos de los estambres. **D.** Acercamiento a un estoma (flecha) del nectario con secreción de néctar y cristales poligonales (cabeza de flecha). **E.** Ovario de una flor bisexual con múltiples óvulos. **F.** Óvulo maduro de una flor bisexual con funículo que contiene tricomas en la epidermis ventral. **An,** anteras; **Es,** estilo; **Ne,** nectario; **P,** papila estigmática; **St,** estigma.

Una de las aportaciones acerca de la sexualidad floral del presente trabajo es que al analizar los detalles de las flores en antesis de los individuos que inicialmente fueron sexados como masculinos (estériles femeninos), se evidenció que las anormalidades que afectan la función femenina de algunas flores se ve reflejada con la presencia de ovarios reducidos (con todos o algunos óvulos abortivos), carencia de estigmas y estilos. Lo cual no se debe a una esterilidad del gineceo, sino que *N. mezcalaensis* es sensible a algunos insectos parásitos que ovipositan en las flores y sus larvas se comen completa o parcialmente algunos estigmas, estilos y óvulos. De tal manera que algunos óvulos no completan su desarrollo, se forman funículos largos que se colapsan cerca de la antesis y no se observan nucelas (Figs. 11A-B), otros óvulos llegan a iniciar los primordios de los tegumentos e incluso se diferencia la célula madre de la megaspora, pero ésta nunca entra en meiosis.

Existen otras flores con óvulos que tienen un crecimiento de nucela y en ella se da la diferenciación de la célula madre de megaspora, sin embargo, los tegumentos no crecen (Fig. 11C). Sin embargo hay óvulos que se desarrollan normalmente como en las flores hermafroditas, que forman un saco embrionario normal, se presenta la fecundación y se convierten en semillas (lo cual se describe más adelante en la sección de desarrollo de óvulo).

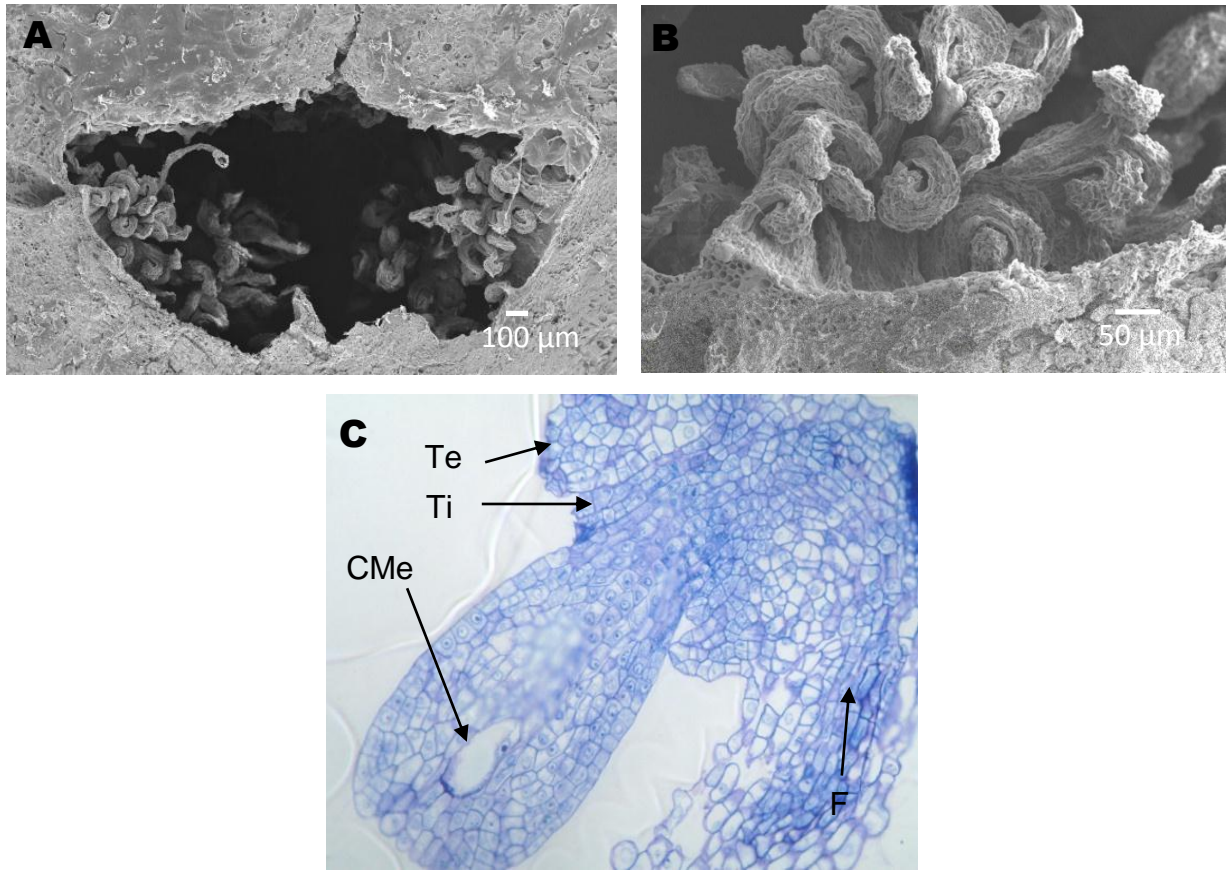


Figura 11. Ovarios con óvulos atrofiados. **A.** Ovarios reducidos con óvulos atrofiados en antesis. **B.** Acercamiento a óvulos atrofiados sin diferenciación de tegumentos. **C.** Ovulo con nucela desarrollada en etapa de célula madre de la megaspora pero con tegumentos atrofiados (flechas). **CMe**, Célula madre de la megaspora. **F**, Funículo. **Te**, Tegumento externo. **Ti**, Tegumento interno.

Los estigmas y estilos de las flores que inicialmente fueron marcadas como masculinas, son funcionales, ya que los granos de polen se adhieren a los estigmas y germinan (Figs. 12A-B). Los tubos polínicos crecen a través del estilo por el tejido de transmisión (Figs. 12C-D) hasta alcanzar a los óvulos y si es que existen óvulos viables, efectuar la fecundación.

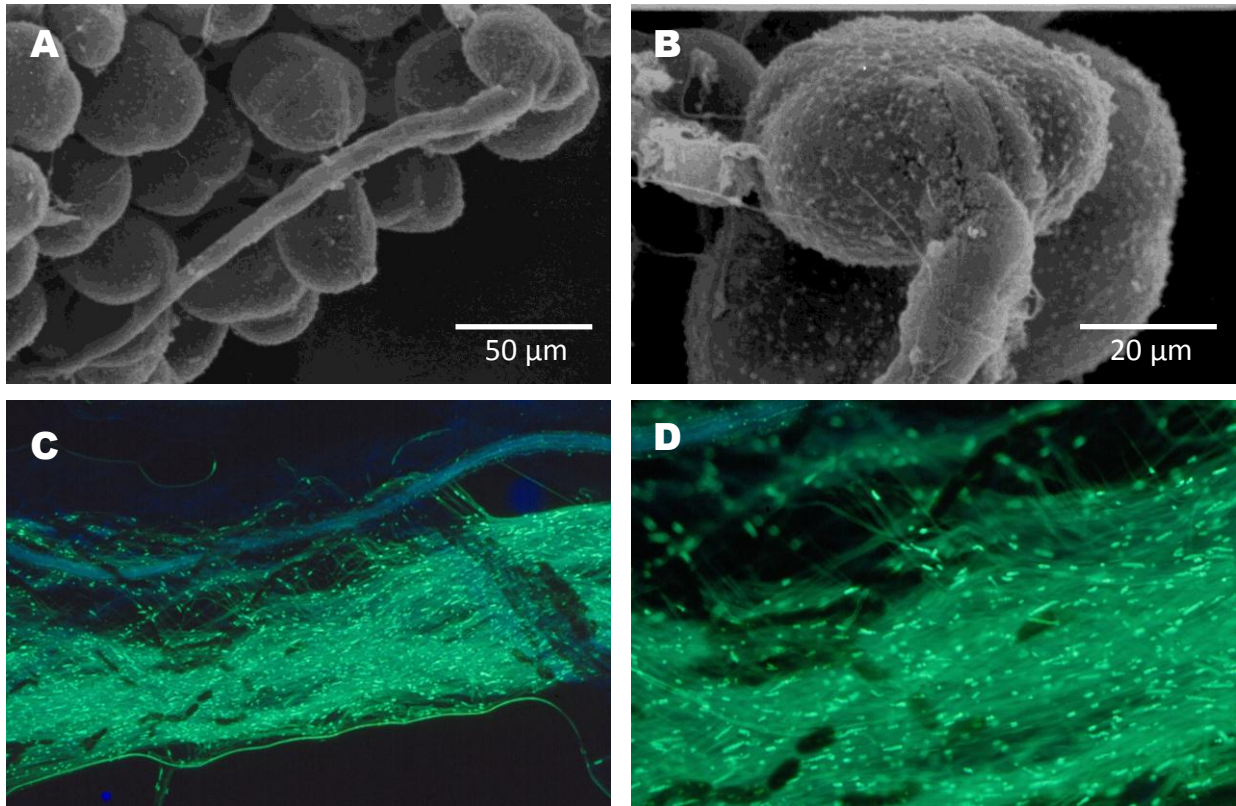


Figura 12. Los estigmas y los estilos de las flores de *N. mezcalaensis* son funcionales, inclusive, aquellos con ovarios reducidos o con óvulos abortivos. **A.** Grano de polen germinando sobre las papilas en el estigma. **B.** Acercamiento del grano de polen germinando, el tubo polínico sale por una de las aperturas en la exina. **C.** Granos de polen germinando sobre estigma de flor con óvulos abortivos. **D.** Tubos polínicos (fluoresciendo en verde) creciendo a través del tejido de transmisión de una flor con ovario reducido.

Desarrollo del óvulo

Los primordios ovulares de *N. mezcalaensis* surgen de una placenta parietal (de los márgenes de los carpelos). El tejido nucelar que forma a cada primordio de óvulo comienza a curvarse debido a un crecimiento asimétrico y surgen los primordios de los dos tegumentos (Fig.13A). Provocando la adición de células en el tegumento externo en la zona más alejada del funículo, mientras que justo cerca del funículo el tegumento externo es indistinguible (Fig. 13B-C). Conforme el primordio del óvulo crasinucelado va creciendo, la curvatura de éste se hace más pronunciada (Figs. 13C).

En etapas tempranas (correspondiente a la fig. 13A) se observa que debajo de la epidermis nucelar se diferencia una célula de mayor tamaño, la célula arquesporrial (Fig. 13D), la cual se divide periclinalmente y origina a la célula parietal (en posición subepidérmica) y a la célula madre de la megaspora (Fig. 13E). La célula parietal se divide anticlinalmente y la célula madre de la megaspora aumenta de tamaño (Fig. 13F) para entrar a meiosis I, formando una diada; esta división es longitudinal, lo cual llama la atención ya que no es común en Cactaceae (Fig. 13G).

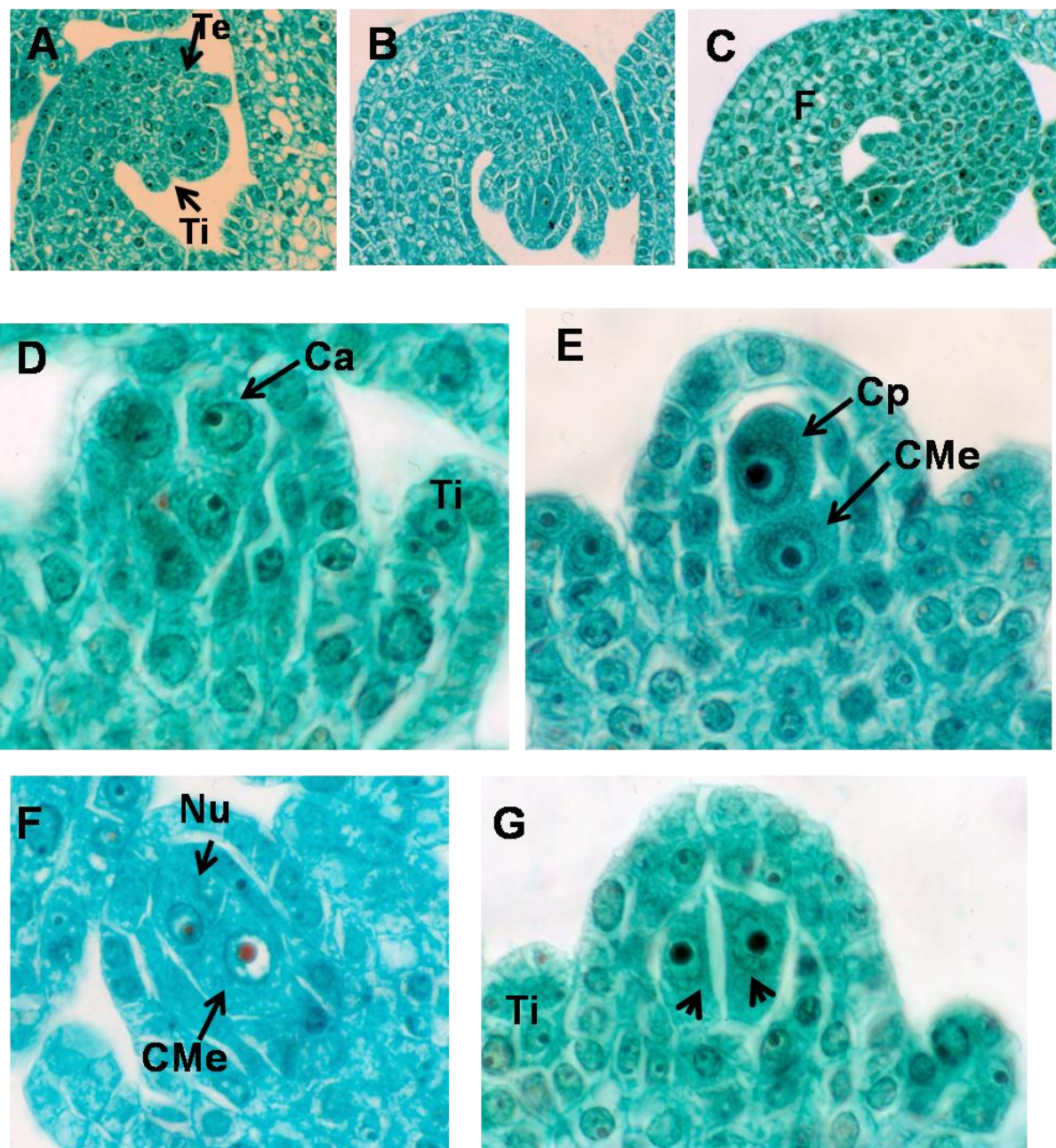


Figura 13. Desarrollo de óvulos fértiles en *N. mezcalaensis*. **A.** Primordio de óvulo con iniciación de tegumentos. **B.** Primordio de óvulo curvándose y alargamiento del funículo. **C.** Mayor curvatura del óvulo. **D.** Diferenciación de la célula arquesporial en un primordio de óvulo. **E.** Célula parietal y célula madre de la megaspora producidas por división mitótica de la célula arquesporial. **F.** División anticlinal de la célula parietal para aumentar la nucela. **G.** Meiosis I de la célula madre de la megaspora formando una díada (flechas). **Ca**, célula arquesporial; **CMe**, célula madre de la megaspora; **Cp**, célula parietal; **F**, funículo; **Nu**, nucela; **Te**, tegumento externo; **Ti** tegumento interno.

Una de las células de la díada no entra a meiosis II, pero la otra sí, formándose en lugar de tétrada, una triada. No se observaron todas las etapas de desarrollo del saco embrionario, pero la conformación final de éste es heptacelular y octanucleado. El óvulo maduro es campilótropo, crasinucelado, bitégmico y endóstomo. El funículo es largo y en su parte ventral presenta tricomas que durante la antesis están en íntimo contacto con el micrópilo, funcionando como un obturador (Fig. 14A). Las dos sinérgidas tienen apariencia piriforme (Fig. 14B). Los óvulos que alcanzan la madurez en las flores en antesis son fecundados, aun cuando convivan con óvulos atrofiados, ya que se observó la presencia de un cigoto (Fig. 14C) y algunas semillas en desarrollo (Fig. 14D).

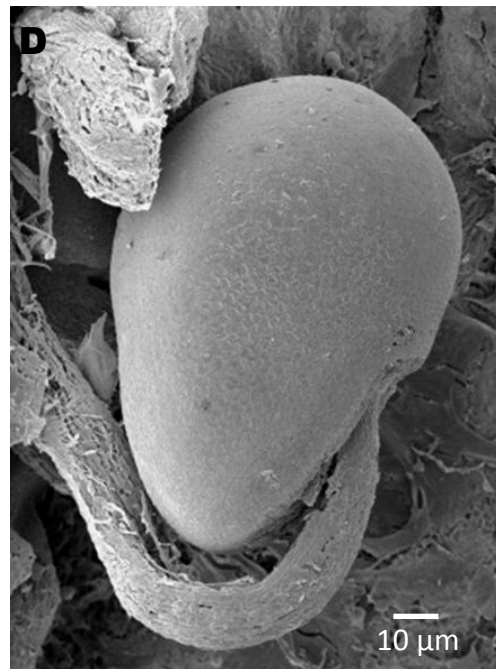
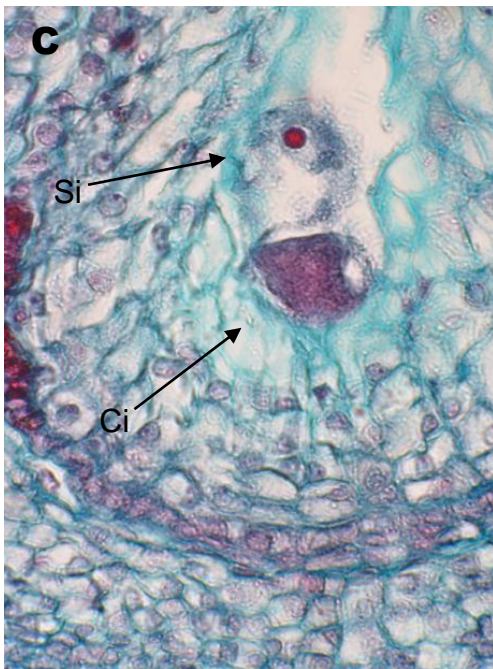
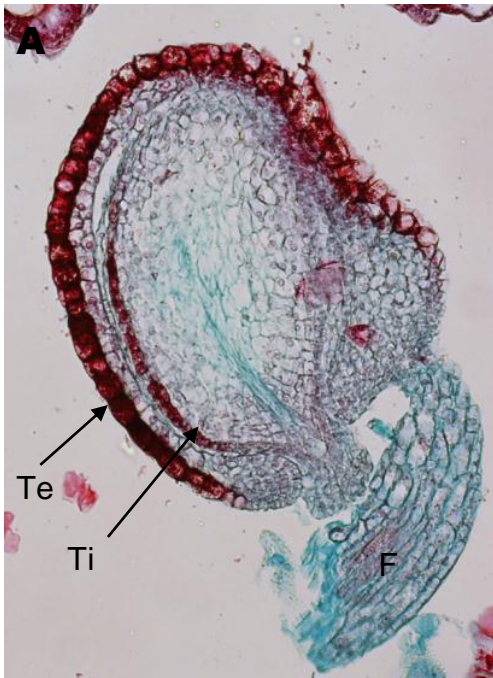


Fig. 14. A. Ovulo maduro bitégmico . B. Saco embrionario con acercamiento a sinérgidas. C. Cigoto y sinérgida degenerando. D. Semilla joven de un fruto. Ci, Cigoto; F, Funiculo. Si, sinérgidas; Te, Tegumento externo. Ti, Tegumento interno.

Desarrollo de anteras y granos de polen

Las anteras de *N. mezcalaensis* son bilobuladas, tetrasporangiadas y forman granos de polen viables. La pared de la antera en etapa de célula madre de la microspora se distingue con cuatro capas celulares, la epidermis, el endotecio, la capa media y el tapete (Figs. 15A-B). La microsporogénesis es sincrónica en todas las anteras. En la pared de la antera se distingue un tapete secretor (Fig. 15C). Las células madres de las microsporas se rodean de calosa y entran en meiosis formando tétradas de microsporas tetraédricas también rodeadas de calosa (Fig. 15D).

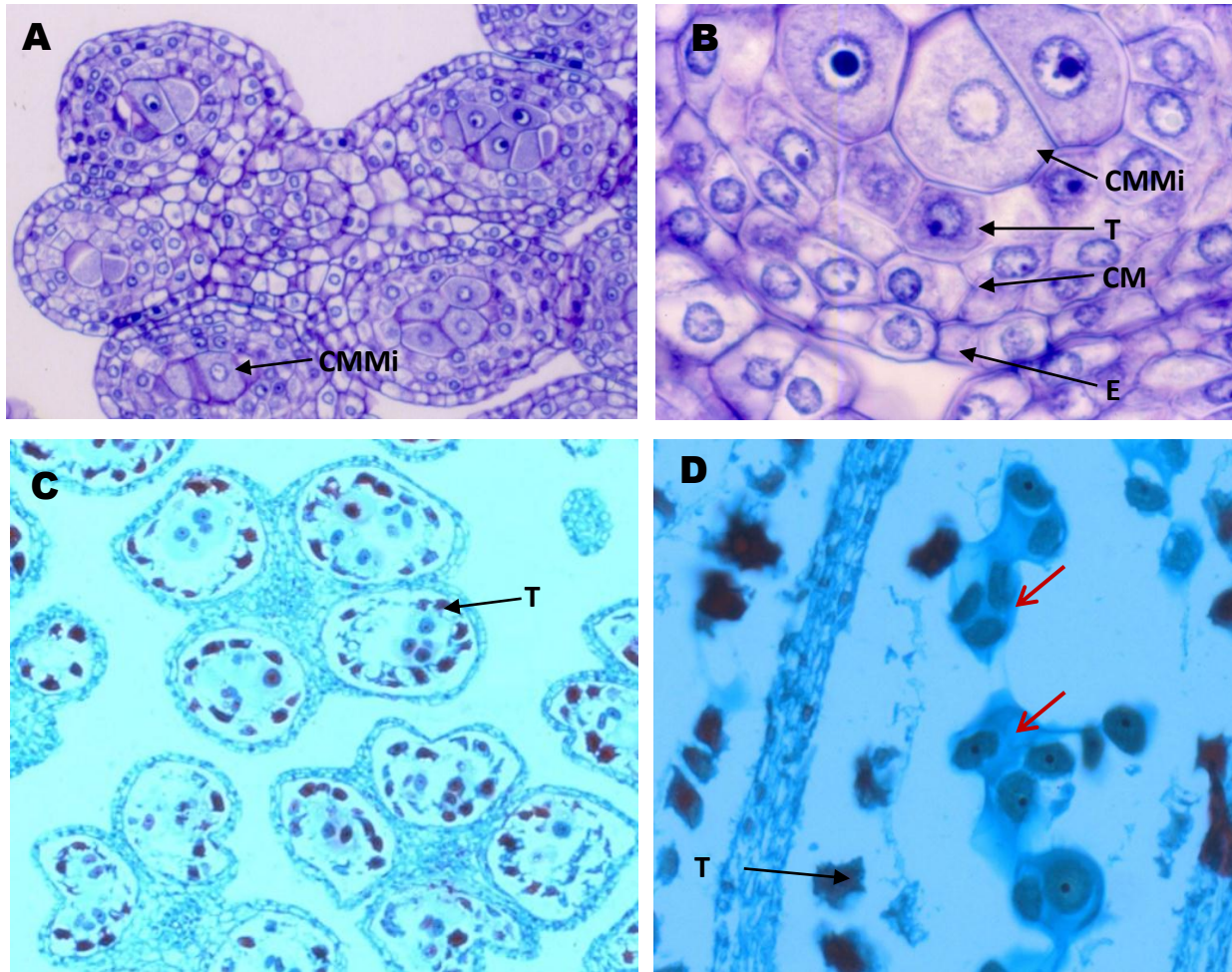


Figura. 15. Desarrollo de anteras y granos de polen. **A.** Antera en etapa de célula madre de la megaspora. **B.** Acercamiento de un microsporangio con pared de antera formada por epidermis, endotecio, capa media y tapete. **C.** Antera en etapa de tétrada mostrando un tapete secretor. **D.** Tétradas de microsporas tetraédricas (Flechas rojas). **CMMi**, célula madre de la microspora. **CM**, Capas medias. **E**, Epidermis. **T**, tapete.

Cada una de las microsporas son liberadas de la pared de calosa y se encuentran en cada microsporangio rodeadas de una pared de antera con una epidermis, un endotecio y un tapete secretor que comienza a degenerar (Fig. 16A). Las anteras tienen una línea de dehiscencia longitudinal que crece a lo largo de cada par de microsporangios (Fig. 16B) y en su interior se observan granos de polen tricelulares, tricolpados y con exina espinulada (Figs. 16C-D).

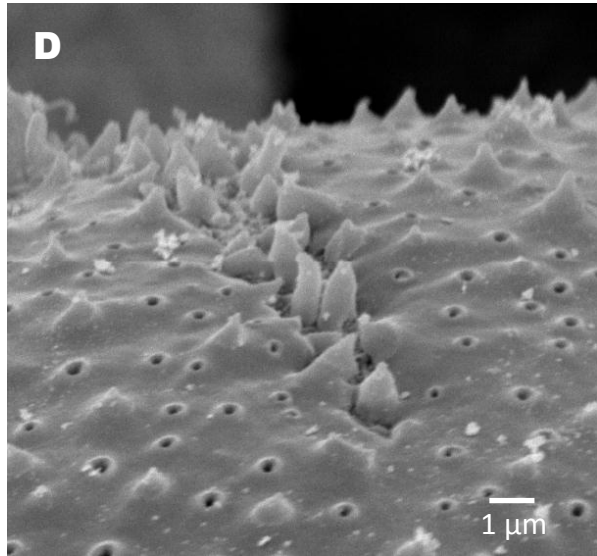
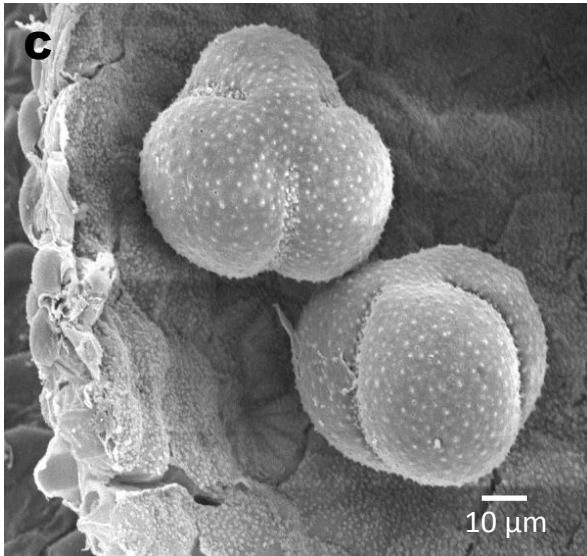
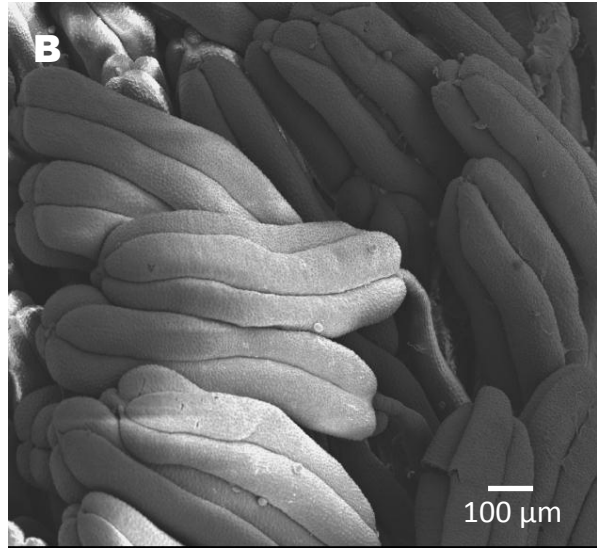
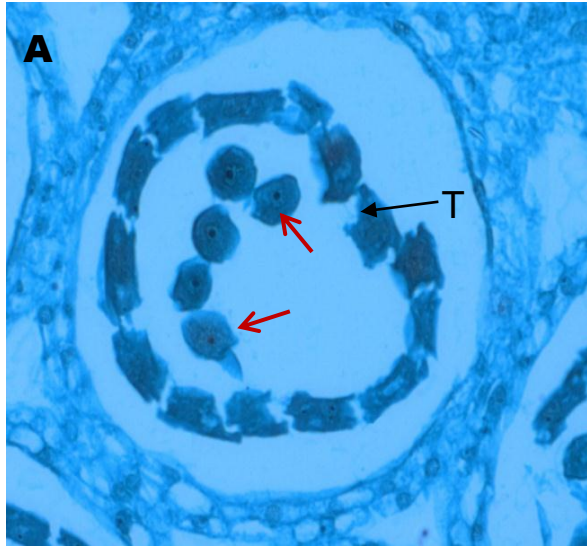


Fig. 16, A. Microsporas libres de la tétrada (Flechas). **B.** Anteras maduras mostrando la línea de dehiscencia. **C.** Granos de polen maduros tricolpados. **D.** Acercamiento a la exina y un colpo. **T.** Tapete.

Es importante mencionar que la presencia larvas, algunas veces llenaba el ovario en desarrollo, muchas veces comiéndose los óvulos e incluso semillas (Figs. 17 y 18 A). Sólo en algunos casos fueron encontrados algunos frutos maduros que provenían de individuos donde ya se habían encontrado flores parasitadas.

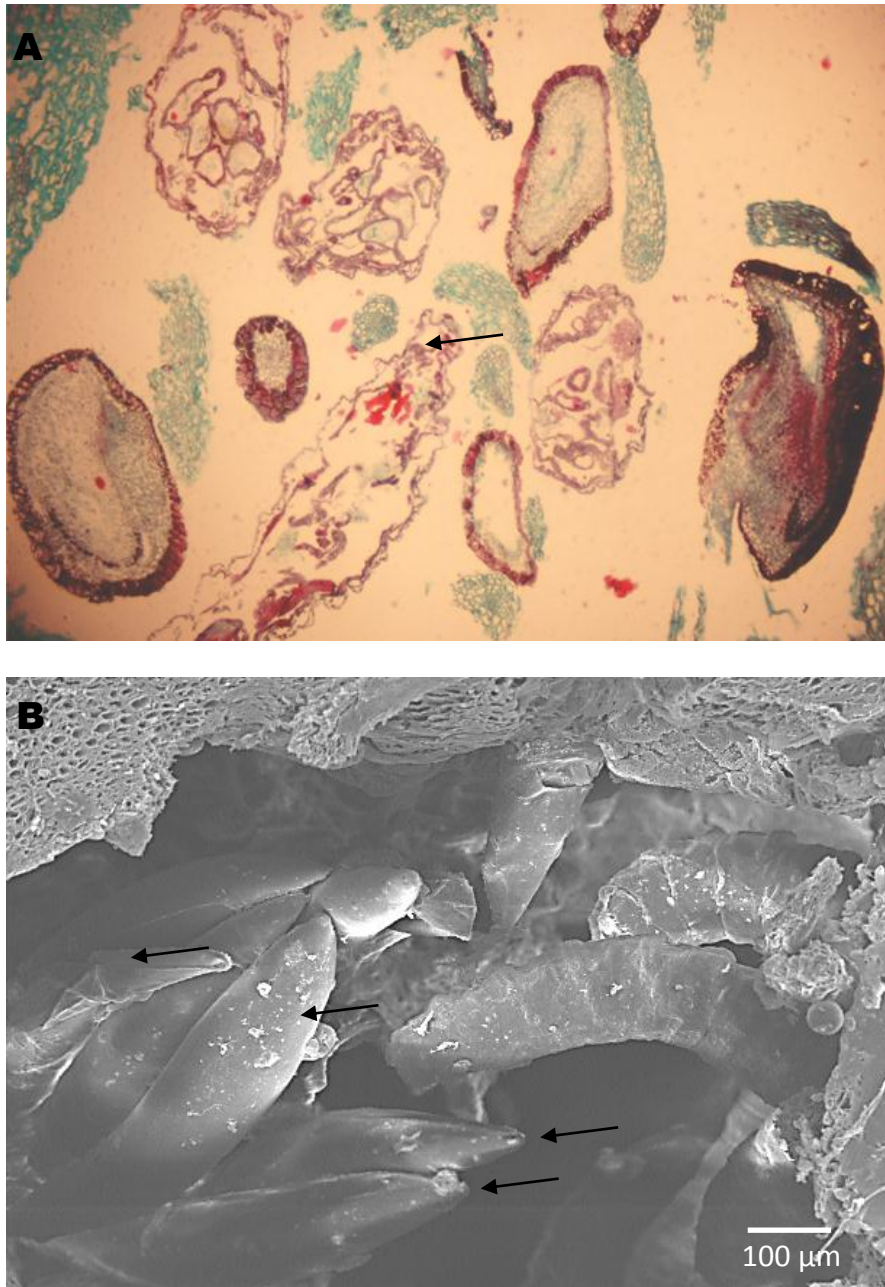


Fig. 17. A. Corte de ovario parasitado. Se observan óvulos desarrollados con funículos. También se observan larvas de insectos. Antesis. 35X. **B.** Larvas dentro de un ovario con escasos óvulos. Pre-antesis. MEB 100X.



Fig. 18. A. Corte de ovario parasitado, se observan las larvas ocupando todo el espacio. Antesis 5X. B. Fruto sin parasitar. Antesis. 5X.

DISCUSIÓN

En las tres localidades estudiadas de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán (RBTC) donde se encuentra *Neobuxbaumia mezcalaensis*, especie que inicialmente fue descrita como androdioica por presentar dos tipos de individuos, uno con flores hermafroditas y el otro tipo masculino que no forma semillas (Valiente, 1997). Sin embargo, el presente análisis embriológico y anatómico evidenció ciertas particularidades de los supuestos individuos masculinos que hacen replantear la definición de un sistema androdioico a hermafrodita, con problemas de formación de óvulos y semillas que se ve afectada por parasitismo de insectos aún no determinados. Estos individuos no desarrollan óvulos normales porque los parásitos y sus larvas se comen estas estructuras, incluso el estigma y estilo de algunas flores. El ataque de los parásitos puede ser tan drástica algunos años que existan individuos en los cuales no se formen frutos.

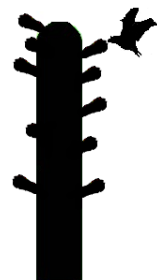
Lo anterior plantea que la información generada aporta un mayor detalle sobre el sistema de reproducción sexual de la población de *N. mezcalaensis* de la RBTC, llevándonos a plantear que la población es hermafrodita. Sin embargo, no se descarta que existan poblaciones completamente androdioicas en el territorio completo de la distribución de la especie.

Lo que sigue llamando la atención es la escasa presencia de este sistema sexual androdioico, no sólo en Cactaceae si no en general en todas las angiospermas. En cactáceas sólo *Pereskia quisqueyana* ha sido también reportada como androdioica (Leuenberger, 1986), pero no se conocen los detalles del desarrollo floral. Sin embargo, en la actualidad se está estudiando el desarrollo floral de *P. quisqueyana* (I. Alfaro Pereira y S. Vázquez Santana, com. Personal).

La embriología general de *N. mezcalaensis* es semejante a la de varias especies estudiadas de Cactaceae con flores hermafroditas.

La megasporogénesis y la megagametogénesis presentan características descritas para otras especies de cactáceas: tegumentos de origen dérmico; excepto que la meiosis I es longitudinal y no se forma una triada de megaspora lineal como en otras especies de Cactaceae, en donde la megaspora en posición calazal es la funcional y desarrolla un saco embrionario de tipo *Polygonum*. (Johri *et al.*, 1992; Jiménez, 2002; Núñez, 2004; Sánchez, 2007; Silva, 2007; Hernández, 2008; Alfaro, 2008; Camacho, 2009). La peculiaridad de *N. mezcalaensis* es que la primera división de la megaspora funcional es longitudinal, lo cual no ha sido reportado para ninguna especie de Cactaceae.

Debido a este punto es que considero que *N. mezcalaensis* no es una especie androdioica sino hermafrodita como la mayoría de las especies de Cactaceae, ya que la formación de óvulos anormales, ovarios, estigmas y estilos reducidos, no se debe a esterilidad, ya que estas anormalidades en el desarrollo son inherentes a la genética del desarrollo de la planta, sino que se deben a factores externos como la depredación o parasitismo. Pero, se necesitan más estudios que confirmen a qué organismos herbívoros es susceptible *N. mezcalaensis* y cuál es la afectación real de su parasitismo que repercute en la contribución de semillas en la población. Asimismo que órganos se ven más o menos afectados durante el desarrollo floral, como óvulos, anteras, frutos, semillas y tépalos.



CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que la población estudiada de *Neobuxbaumia mezcalaensis* no es androdioica, sino hermafrodita, pero en la que algunos de sus individuos presentan atrofia en gineceo y fruto y por lo tanto, no todos forman semillas.

El desarrollo embrionario de *N. mezcalaensis* es semejante respecto de los demás miembros de la familia Cactaceae, en los cuales los tegumentos son de origen dérmico y forma un saco embrionario de tipo Polygonum. Sin embargo, la primera división de la megaspora es longitudinal, en lugar de ser transversal como en las demás cactáceas.



LITERATURA CONSULTADA

- Ainsworth, C. 2000. Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. *Annals of Botany* 86: 211 – 221.
- Akimoto J., T. Fukuhara y K. Kikuzawa. 1999. Sex Ratios and Genetic Variation in a Functionally Androdioecious Species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany* 86 (6): 880 – 886.
- Alejos L., J. Campos, P. Dávila y M. Martínez. 2002. Normatividad para la conservación de las especies mexicanas: El caso de la cactácea columnar *Neobuxbaumia macrocephala* bajo criterios del Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER). *Ciencia y desarrollo en Internet*. <http://www.conacyt.mx>
- Alfaro A. I. 2008. Estudio de muerte celular programada durante el desarrollo de las anteras en flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* Engelman y *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 61pp.
- Anderson, E. 2001. *The cactus family*. Timber press. USA. 776 pp.
- Areces-Mallea, A. E. 1992. *Pereskia marcanoi*, a new species of Cactaceae from Hispaniola. *Brittonia* 44 (4): 423-428.
- Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* XLIV: 109 - 115.
- Arias, A., M. Valverde y J. Reyes. 2001. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 72 pp.
- Arias, S. y T. Terrazas. 2006. Análisis cladístico del género *Pachycereus* (Cactaceae) con caracteres morfológicos. *Brittonia* 58 (3): 197 – 216.
- Arreola, H. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: Valle, C. (Ed) *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México.
- 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.
- Barrett, S. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plant. *Trends in Plant Science* 3(9): 335 - 341.

- Barrett, S. 2002. The Evolution of Plant Sexual Diversity. *Nature*. 3:274-284.
- Bawa, K. S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 15 - 39.
- Bawa, K. y J. Beach. 1981. Evolution of Sexual Systems in Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 254 - 274.
- Bhojwani, S. y S. Bhatnagar. 2000. The embryology of Angiosperms. Vikas Publishing House PVT LTD.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. 2ª Ed. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bravo-Hollis, E. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. Ed. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 233 pp.
- Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México. Vols. II y III. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- 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.
- Casas, A. 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. *Biodiversitas* 40: 18 – 23.
- Casas, A., J. Caballero y A. Valiente-Banuet. 1999. Use, management and domestication of columnar cacti in south-central Mexico: A historical perspective. *Journal of Ethnobiology* 19: 71-95.
- Charlesworth, B. y Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* 112 (988): 975-997.
- Del Castillo, R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo. México.
- Esau, K. 1982. Anatomía de las Plantas con Semilla. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 512 pp.
- Fleming, T. H., S. Maurice, S. L. Buchmann y M. D. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81: 858-867.

- 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.
- Ganders, E. R. y H. Kennedy. 1978. Gynodioecy in *Mammillaria dioica* (Cactaceae). Madroño. 25: 234.
- Haber, W. A., y K. S. Bawa. 1984. Evolution of dioecy in *Saurauia* (Dilleniaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 71: 289 – 293.
- Hernández, H. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Acta Botánica Mexicana 26 : 33-52.
- 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, M. T. 1992. Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. American Journal of Botany 79 (12): 1382-1388.
- Johri B. M., K. B. Ambegaokar y P. S. Srivastava. 1992. Comparative embryology of angiosperms. Vol 1. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 614 pp.
- Jiménez K. 2002. Embriología de *Pereskia lychnidiflora*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 65pp.
- Kimnach M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. Cactus and Succulent Journal 54: 3-7.
- Lebel-Hardenack, S. y S. Grant. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. Trends in Plant Science 2:130-136.
- Leuenberger, B. E. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). Memoirs of The New York Botanical Garden. 41:1-141.
- Lindsay, G. y E. Y. Dawson. 1952. Mammillarias of the Islands Off Northwestern Baja California, México. Cactus and Succulent Journal 24: 77-84.
- Luna C. y J.R. Aguirre. 2001. Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de la pitaya mixteca en México. Interciencia 26 (1): 18 – 24.

- Mauseth, J. 1998. Botany. An introduction to plant Biology. Jones and Bartlett Publishers. EUA. 794 pp.
- Mandujano, M., J. Gulobov y J. Reyes. 2002. Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. Biodiversitas 40: 4 – 7.
- Mondragon, J.C., 2001. Verification of the apomictic origin of cactus pear (*Opuntia spp.* Cactaceae) seedling of open pollinated and cross from Central Mexico. Journal of the Professional Association for Cactus Development 4: 49 – 56.
- Negron-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.
- Negron-Ortiz, V. y L. Strittmatter. 2004. Embryology of floral dimorphism and gender system of *Consolea corallicola* (Cactaceae), a rare species of the Florida Keys. Haseltonia 10: 16-25.
- Núñez M. C. 2004. Cactáceas columnares de México: estudio embriológico de cinco especies de la tribu *Pachycereae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 178pp.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelmann (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 82 pp.
- 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.
- Pannell, J. 2002. The evolution and maintenance of androdioecy. Annual Review of Ecology and Systematics 33: 397-425.
- Paredes M., R. Lira y P. Dávila. 2007. Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. Acta Botánica Mexicana 79: 13 – 61.
- Pimienta, B. y H. Ramírez. 1999. Contribuciones al conocimiento agronómico y biológico de los nopales tuneros. Agrociencia 33, 323–331.
- Rebman, J. P. 1998. A new cholla (Cactaceae) from Baja California, México. Haseltonia. 6: 17-21.
- Rebman, J. P. y D. J. 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* 82:596-606.
- Rieseberg, L., M. Hanson y T. Philbrick. 1992. Androdioecy is Derived from Dioecy in Datisceae: Evidence from restriction Site Mapping of PCR-Amplified Chloroplast DNA Fragments. *Systematic Botany* 17 (2): 324 – 336.
- Ruedas, M. 2003. Análisis de los factores que afectan la distribución y abundancia de tres especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae) en la región de Tehuacán - Cuicatlán. Tesis de Maestría (Biólogo), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 110 pp.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México, D.F. 432 pp.
- Sánchez, D. 2007. Embriología de *Mammillaria dioica* K. Brandegees (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 52 pp.
- Scheinvar, L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro: diversidad y riqueza. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 390 pp.
- Silva, J. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 61pp.
- Strittmatter, L. y V. Negrón-Ortiz. 2000. Floral dimorphism in two species of *Consolea* (Cactaceae): implications for mating system and taxonomy. En libro de resúmenes Symposium 2000, The flora of the Greter Antilles, p: 47.
- Strittmatter, L., V. Negrón-Ortiz y R. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* 89:1373-1387.
- Strittmatter, L., V. Negrón-Ortiz y R. Hickey. 2006. Comparative microsporangium development in male-fertile and male-sterile flowers of *Consolea* (Cactaceae): When and how does pollen abortion occur. *Grana* 45: 81-100.
- Trujillo, A. y E. González. 1991. Hibridación, aislamiento y formas de reproducción en *Opuntia spp.* *Agrociencia (Serie Recursos Naturales Renovables)* 1: 39 – 58.
- Valiente-Banuet, A., A. Rojas-Martínez, M. C. Arizmendi y P. Dávila. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *American Journal of Botany* 84 (4): 452-455.
- Valiente-Banuet, A. 2002. Vulnerabilidad de los sistemas de polinización de cactáceas columnares de México. *Revista Chilena de Historia Natural*. 75: 99 – 104.

- Vélez, G.C., G.B. Rodríguez. 1996. Microscopic analysis of poliembryony in *Opuntia ficus-indica*. Journal of the Professional Association for Cactus Development 1: 39 – 48.
- Weiblen G., R. Oyama y M. Donoghue. 2000. Phylogenetic Analysis of Dioecy in Monocotyledons. The American naturalist 155(1): 46 – 58.
- Wolf, D., J. Satkoski, K. White y L. Reisenberg. 2001. Sex determination in the androdioecious plant *Datisca glomerata* and its dioecious sister species *D. cannabina*. Genetics 159:1243-1257.
- Wolf, D. y N. Takebayashi. 2004. Pollen limitation and the evolution of androdioecy from dioecy. The American Naturalist 163: 122-137.

Software citado

- . Google Earth version 5.1. Macrovision Corporation. 2008

Referencias de Internet

- Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. 2008. Apéndices I, II y III. <http://www.cites.org>
- Atlas de Carreteras del estado de Puebla. Dirección General de Planeación, Secretaría de Comunicaciones y Transportes. México. <http://dgp.sct.gob.mx/fileadmin/Atlas/puebla.pdf>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. NOM-059-SEMARNAT-2000 PROTECCIÓN AMBIENTAL. ESPECIES NATIVAS DE MÉXICO DE FLORA Y FAUNA SILVESTRES – CATEGORÍAS DE RIESGO Y ESPECIFICACIONES PARA SU INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN O CAMBIO – LISTA DE ESP ECIES EN RIESGO. <http://www.profepa.gob.mx>

