



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Efecto de las auxinas en la esterilidad femenina de *Opuntia stenopetala*
Engelm. (Cactaceae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ALDEBARAN CAMACHO VELÁZQUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
(FACULTAD DE CIENCIAS)

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
(FACULTAD DE CIENCIAS)

DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
(INSTITUTO DE BIOLOGÍA)



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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Efecto de las auxinas en la esterilidad femenina de *Opuntia stenopetala*
Engelm. (Cactaceae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ALDEBARAN CAMACHO VELÁZQUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
(FACULTAD DE CIENCIAS)

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
(FACULTAD DE CIENCIAS)

DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
(INSTITUTO DE BIOLOGÍA)



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/485/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de abril de 2013** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **CAMACHO VELÁZQUEZ ALDEBARAN** con número de cuenta **300004595** con la tesis titulada "**Efecto de las auxinas en la esterilidad femenina de *Opuntia stenopetala* Engelm. (Cactaceae)**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**:

Presidente: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
Vocal: DRA. FLORENCIA TIBERIA AUCÁN GARCÍA CAMPUSANO
Secretario: DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Suplente: DR. GREGORIO OROZCO ARROYO
Suplente: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de septiembre de 2013

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca de mis estudios de maestría, con número de becario 255140.
- Por el financiamiento otorgado por parte del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT, Proyecto IN 226808) y del CONACYT (proyecto 101771) bajo la coordinación de la Dra. Sonia Vázquez Santana, proyectos del cual tomo parte.
- A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra Patricia Guevara Fefer y Dr. Ángel Salvador Arias Montes, por su apoyo académico, sugerencias y observaciones.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis padres por su apoyo incondicional, enseñanzas, lecciones y cuidados.

A mi hermano por su ayuda para que esto fuera posible.

A mi familia por animarme a finalizar esta investigación y por su cariño.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Adrián, Ale, Alfredo, Almita, Ana, Anabel, David, Diana, Eli, Fernando, Isabel, Jorge, Karla, Luis, Lulu, Magali, Mario, María F., Melb, Monty, Mony, Nadia, Nancy, Rocío, Rodrigo, Rubí, Saúl, Ulises, Vicente y Wendy por haber compartido esos días de reuniones, comidas... que fueron muy divertidas.

A las profesoras Judith, Mague, Sony, Karina, Paty, Ana Laura, Clara, Mony, Ricardo y Javier por sus comentarios, pláticas y enseñanzas.

A mi asesora Sony por brindarme su apoyo, paciencia y conocimiento durante el desarrollo de esta investigación, gracias.

Y a todos aquellos que olvide y tuvieron algo que ver en la realización de esta investigación, gracias.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A la Dra. Patricia Guevara Fefer y al Dr. Salvador Arias Montes, por formar parte del comité tutoral de esta investigación.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Florencia García Campusano y al Dr. Gregorio Orozco Arroyo, por sus observaciones y comentarios en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías y a la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias, por su apoyo en el procesamiento y toma de fotografías en el Microscopio Electrónico de Barrido.

A la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín del laboratorio de Microcine por su ayuda en la toma de microfotografías.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco y al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong, por su asesoría durante el trabajo de laboratorio para la realización de este trabajo.

A la Dra. María Felix Ramos Ordoñez por su apoyo en el trabajo estadístico.

A la M. en C. Rocío Hernández Cruz, Biól. Magali Espinosa Sánchez, Biól. Ana Isabel Alfaro Pereira, Biól. Saúl Gómez Sánchez y al P. de Biól. Nadia Castro Cárdenas, por su ayuda en el trabajo de campo.

*Esta tesis la dedico a mis padres por brindarme su amor incondicional,
valores, ejemplos, consejos y sacrificios en todo momento,
para cumplir cada uno de mis triunfos,
son los mejores.*

*A mi hermano por estar a mi lado
y brindarme su apoyo
cuando se lo pido.*

*A mi asesora Sony
por el apoyo que me proporciono
durante el desarrollo de esta investigación,
su paciencia para trasmitirme sus conocimientos y su cariño.*

どうもありがとうございます

doumo arigatou gozaimasu

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
Sistemas sexuales en angiospermas	7
Sistemas sexuales en la familia Cactaceae	8
El papel de las hormonas en el desarrollo floral	9
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Sistema de estudio	14
Sitio de colecta	14
Colecta del material	15
Tratamientos	15
Prueba para determinar la funcionalidad de los estigmas	16
Análisis morfológico e histológico de los gineceos de ambos morfos florales	16
Observación de tubos polínicos	18
Análisis estadísticos	19
RESULTADOS	20
Una sola aplicación exógena de auxina (ANA) a nivel del ovario	20
Una sola aplicación del inhibidor del transporte de auxinas (Naptalam, NPA) a nivel del ovario	25
Tres aplicaciones exógenas de auxina (ANA) a nivel del ovario	29
Tres aplicaciones del inhibidor del transporte de auxinas (Naptalam, NPA) a nivel del ovario	35
Análisis a nivel del ovario de las flores masculinas que se trataron exógenamente con auxina (ANA) disuelta en lanolina, en la parte apical del estilo	39
Desarrollo de óvulos de flores masculinas del tipo 1 que fueron tratadas exógenamente con auxina (ANA)	43
Aplicación exógena de auxina (ANA) disuelta en lanolina, en la parte apical del estilo de flores masculinas	45
Funcionalidad de los pistilos de flores masculinas tratadas exógenamente con auxina (ANA) disuelta en lanolina	48

DISCUSIÓN	52
Comparación de pistilos de especies con flores masculinas en Cactaceae	52
Hormonas y procesos involucrados en la diferenciación sexual	54
La importancia de las auxinas en el desarrollo del gineceo y su papel en la unisexualidad de <i>Opuntia stenopetala</i>	56
Modelo del desarrollo de flores masculinas en <i>O. stenopetala</i>	58
CONCLUSIONES	62
PERSPECTIVAS	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ARTÍCULO PUBLICADO	69
ANEXOS	84

RESUMEN

En la familia Cactaceae alrededor del 1 % de las especies que la conforman presentan flores unisexuales, como es el caso de *Opuntia stenopetala* que posee un sistema reproductivo dioico.

Las flores masculinas de *O. stenopetala* presentan un androceo fértil, mientras que el gineceo se encuentra reducido, sin tejido estigmático, el estilo es corto y el ovario es reducido, con tres variantes fenotípicas en la población: 1) con óvulos anormales que no llegan a la madurez, 2) sin óvulos y 3) sin cavidad de ovario detectable. Las diferencias entre el estilo de la flor femenina y masculina radican en el canal estilar, el tejido de transmisión y los haces vasculares, los cuales no se desarrollan por completo en el gineceo de la flor masculina. Comparando los gineceos de la doble mutante de *Arabidopsis thaliana sty1 sty2* (la cual presenta bajos niveles endógenos de auxinas) con el de *O. stenopetala* se encontró que ambos son reducidos.

En antecedentes previos de nuestro grupo de trabajo se había observado que la microaplicación exógena de auxina (ácido 1-naftaleno acético, ANA) en *O. stenopetala* revierte algunos de los defectos del estilo, resultando un canal estilar más amplio, mayor cantidad de tejido de transmisión, un aumento en la diferenciación de los haces vasculares y el desarrollo de tejido estigmático. Sin embargo, quedaba pendiente saber si el estilo y el tejido estigmático desarrollado después de la aplicación de auxinas eran funcionales, un aspecto que se abordó en el presente estudio. Si fuese así, el desarrollo del tejido estigmático de las flores masculinas de *O. stenopetala* generado por la aplicación exógena de auxinas, permitiría la germinación de los granos de polen y los tubos polínicos en los estilos revertidos crecerían a través de ellos para llegar al ovario. Otra interrogante planteada fue conocer el efecto que provocarían las auxinas al ser aplicadas exógenamente en ovarios jóvenes de flores masculinas.

Para abordar estas preguntas se aplicó exógenamente la auxina (ANA) y el inhibidor del transporte de auxinas Naptalam en botones florales jóvenes de ambos morfos, los cuales se procesaron para ser examinados con diversas técnicas de histología y microscopía.

Los resultados indicaron que las flores masculinas tratadas con las auxinas y polinizadas posteriormente, desarrollaron tejido estigmático y algunos granos de polen germinaron sobre el estigma. Sin embargo, no se observó el crecimiento de tubos polínicos a través del tejido de transmisión. Por otra parte, la aplicación exógena de auxina a nivel de ovario de flores masculinas jóvenes, provocó en las flores de tipo 3 (que no presentan cavidad del ovario), la formación de ovarios reducidos y algunas veces se encontraron primordios ovulares. En las flores de tipo 2 (que presentan cavidad del ovario sin óvulos), se diferenciaron óvulos con mayor desarrollo; mientras que en las flores del tipo 1 (que presentan óvulos anormales), hubo un mayor número de óvulos y una mayor diferenciación de éstos, incluso se formó el saco embrionario.

Los resultados obtenidos en su conjunto permiten concluir que las auxinas han jugado un papel preponderante en la evolución de la unisexualidad en *O. stenopetala*, específicamente durante el desarrollo del gineceo de las flores y por ende en el diocismo.

ABSTRACT

In Cactaceae, about 1% of the species display unisexual flowers, as it happens in *Opuntia stenopetala*, which possesses a dioecious reproductive system.

Male flowers of *O. stenopetala* present a fertile androecium, while the gynoecium is reduced, without stigmatic tissue and a short style. With respect to the ovary, three phenotypic variants were detected in a natural population: 1) ovaries with abnormal ovules that do not reach maturity, 2) ovaries without ovules and 3) no ovarian cavity. In addition, the gynoecium in male flowers shows some abnormalities in the stylar canal, transmitting tissue and the vascular bundles, compared with female flowers.

Previously we have observed that exogenous auxin micro-applications (1-naphthalene acetic acid, NAA) in *O. stenopetala* reverted some style defects resulting in a wider stylar canal, a more abundant transmitting tissue, an increase in the differentiation of the vascular bundles and the development of stigmatic tissue. However, we were not able to evaluate if these changes were enough to allow pollen germination and pollen tube growth through the transmitting tract tissue to reach the ovary, which was one of the main objectives in this research. A second objective was to determine the effect that would cause auxins when applied exogenously in young ovaries of male flowers.

To address these objectives, exogenous auxin (NAA) was applied together or not with the auxin transport inhibitor Naptalam, in young flower buds of male and female flowers, which are subsequently processed to histology and microscopy analysis.

Our results showed that male flowers treated with auxin and subsequently pollinated, developed stigmatic tissue, which was able to support germination of some pollen grains on this stigmatic-like structure. However, the pollen tube growth through transmitting tissue was not detected. On the other hand, auxin exogenous application at the ovary level of young male flowers, triggered in type 3 flowers (without an ovary cavity), the ovary was formed and in some cases developed ovular primordia. In type 2 flowers (with empty ovarian cavity) the

developed ovules reach a higher differentiation degree, while the type 1 flowers (with abnormal ovules), there was a greater number of ovules and an increased differentiation stage of them, even forming the embryo sac.

Taken together our results we can conclude that auxins have played a preponderant role in the unisexuality evolution in *O. stenopetala*, specifically during gynoecium development and dioecy.

INTRODUCCIÓN

La flor es la estructura reproductora de las angiospermas, está constituida por hojas modificadas y especializadas en las funciones de reproducción y de protección. De la estructura más externa a la más interna de una flor generalmente se encuentran los sépalos y pétalos que representan los verticilos estériles, con función de protección y atracción de polinizadores. Posteriormente el androceo (conjunto de estambres) y el gineceo (conjunto de carpelos) formando los verticilos reproductivos. Los estambres están formados por el filamento y una porción distal llamada antera, siendo esta última la estructura encargada de la producción de los granos de polen (portadores de los gametos masculinos). Los gametos femeninos se producen dentro de los óvulos, donde quedan protegidos por el ovario, el cual junto con el estilo y el estigma constituyen el gineceo o pistilo (Mauseth, 1995; Bhojwani y Soh, 2001).

La presencia de ambos órganos reproductivos en una flor hermafrodita resulta atractivo para los polinizadores, promoviendo el entrecruzamiento, lo cual probablemente ha contribuido a la diversificación de las angiospermas. Sin embargo, la cercanía de los órganos sexuales incrementa la posibilidad de la autopolinización, comprometiendo así la variabilidad genética de las especies (Kuusk, 2003). En las angiospermas existen mecanismos reproductivos para evitar los efectos deletéreos de la depresión endogámica, promoviendo la variabilidad genética y la heterocigosis. Entre estos mecanismos se encuentran: 1) La dicogamia o separación temporal en las funciones masculinas y femeninas de flores hermafroditas, mediante dos tipos, la protandria que ocurre cuando el polen se libera antes de que los estigmas sean receptivos y la protoginia la cual ocurre cuando los estigmas son receptivos antes de que se libere el polen. 2) La hercogamia es un mecanismo que implica una separación espacial de estilos y de anteras dentro de la misma flor, sin embargo, la transferencia del polen entre ellos es posible. 3) La autoincompatibilidad, es decir, la incapacidad de una planta hermafrodita de producir cigotos fértiles producto de la autopolinización. 4) La producción de flores unisexuales femeninas o masculinas en la misma planta, conocido como monoicismo; o en diferentes individuos, llamado dioicismo (Bawa,

1980; Bawa y Beach, 1981; Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993; Barret, 1998, 2002, 2003; Ainsworth, 2000; Cruz *et al.*, 2001).

La mayoría de las especies que tienen flores unisexuales inician el desarrollo con primordios de estambres y carpelos, pero su destino es eliminar uno de los dos sexos, lo cual implica detener el desarrollo en una etapa específica, siendo controlado por factores genéticos, por procesos de muerte celular programada y/o niveles hormonales (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1994; Greenberg, 1996; Calderón-Urrea y Dellaporta, 1999; Caporali *et al.*, 2003; Coimbra *et al.*, 2004; Flores, 2005; Strittmatter *et al.*, 2006; Hernández, 2008; Hartwig *et al.*, 2011; Orozco-Arrollo *et al.* 2012).

Las auxinas son hormonas que participan en la elongación y en la diferenciación celular, así como en el modelaje de órganos (Ståldal *et al.*, 2008). Se ha visto que la aplicación exógena de auxinas como el ácido 1-naftaleno acético en la parte apical del pistilo de flores funcionalmente masculinas de la especie dioica *Opuntia stenopetala*, restaura parcialmente algunos de los defectos morfológicos, incluida la formación de tejido estigmático y mayor cantidad de tejido de transmisión en el estilo (Orozco, 2012). Estos resultados dieron la pauta para investigar si el gineceo parcialmente restaurado es funcional, por lo que cobra importancia investigar si el estigma permite la germinación de granos de polen y así mismo analizar el efecto a nivel del ovario al aplicar exógenamente auxinas.

ANTECEDENTES

Sistemas sexuales en angiospermas

La mayoría de las angiospermas son hermafroditas, presentando flores bisexuales con gineceo y androceo fértiles. El porcentaje reportado varía del 90 % (Lebel-Hardenack y Grant, 1997) al 94 % (Renner y Ricklefs, 1995). Además de este sistema reproductivo, las angiospermas presentan una amplia variedad de sistemas sexuales: monoico, ginomonoico, andromonoico, trimonoico, dioico, ginodioico, androdioico o trioico (Barrett, 1998, 2002; Ainsworth, 2000). El sistema monoico se describe como un sistema sexual donde una misma planta presenta flores femeninas (sólo el gineceo es funcional) y masculinas (sólo el androceo es funcional), mientras que el dioico tiene individuos que sólo producen flores femeninas e individuos que sólo producen flores masculinas (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993; Barrett, 1998; Ainsworth, 2000). El 6 % de las aproximadamente 240 000 especies de angiospermas son dioicas y están representadas en varias familias, lo que sugiere que este sistema reproductivo se ha originado numerosas veces durante la evolución de las plantas con flor (Renner y Ricklefs, 1995; Barrett, 1998).

Durante las etapas tempranas del desarrollo floral de la mayoría de las especies monoicas y dioicas, las flores unisexuales inician su desarrollo siendo bisexuales, ya que los primordios de carpelos y estambres están presentes en el meristemo floral, aunque posteriormente uno de los dos cesa su desarrollo, variando la etapa en que esto sucede. En contraste, pocas especies con flores unisexuales se desarrolla un solo verticilo sexual (androceo o gineceo) desde el inicio, por lo tanto nunca hay vestigios del órgano sexual faltante en anthesis (Ainsworth, 2000; Mitchell y Diggle, 2005), como es el caso de *Spinacia oleracea* (Sherry *et al.*, 1993).

Generalmente se asume que la principal fuerza de selección que favorece la evolución del dioicismo es la endogamia. Sin embargo, existen otras fuerzas de selección como el uso eficiente de los recursos para optimizar las funciones femeninas o masculinas, el dimorfismo sexual, que además modifica la distribución espacial de los recursos disponibles para los polinizadores, la dispersión de semillas y para evitar la depredación (Bawa, 1980; Thomson y

Barrett, 1981; Barrett, 1998). De esta manera se promueve la polinización cruzada obligatoria y se incrementa la diversidad genética.

Sistemas sexuales en la familia Cactaceae

La familia Cactaceae, con alrededor de 200 géneros y unas 2000 especies, es generalmente hermafrodita (Arreola, 1997; Anderson, 2001), rara vez son unisexuales por atrofia de los estambres o del estigma (Arreola, 1997). Sin embargo, únicamente 27 especies agrupadas en 8 géneros que se han reportado presentan poblaciones con un tipo diferente a la condición hermafrodita, tales como los sistemas dioico, ginodioico, androdioico, trioico y subdioico (Anexo 1; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012). *Opuntia stenopetala* presenta un sistema dioico (Bravo-Hollis, 1978; Orozco, 2002).

En las flores unisexuales de las cactáceas, la aborción o la interrupción del desarrollo de androceo o gineceo ocurre en diferentes etapas del desarrollo floral. Lo anterior también ha sido reportado para otras angiospermas con flores unisexuales (Ainsworth, 2000; Mitchell y Diggle, 2005). Dentro de la subfamilia Pereskioideae, *Pereskia portulacifolia* es una especie dioica cuyas flores masculinas no presentan óvulos (Camacho, 2009), lo cual también sucede ocasionalmente en *P. zinniiflora* (Leuenberger, 1986). Mientras que en *O. stenopetala* (subfamilia Opuntioideae) el ovario presenta tres variantes fenotípicas: 1) cavidad del ovario reducido, con óvulos anormales que no llegan a la madurez, 2) cavidad del ovario sin óvulos, y 3) sin cavidad del ovario (Orozco, 2002, 2005; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012). En las flores femeninas la aborción de las anteras sucede antes de la meiosis o en Profase I (Orozco, 2002, 2005; Flores, 2005; Alfaro, 2008; Flores-Rentería *et al.*, 2013). En las flores masculinas de *O. robusta* se llegan a presentar óvulos que degeneran antes de la meiosis, pero en las flores femeninas la aborción de las anteras se presenta después de la meiosis (Silva, 2007; Alfaro 2008; Hernández, 2008). En las siete especies estudiadas del género *Consolea* con flores unisexuales masculinas la aborción ocurre después de la meiosis, mientras que en las flores femeninas se da siempre en la Profase I (Strittmatter *et al.*, 2002, 2006, 2008).

En especies de la subfamilia Cactoideae, se ha descrito que en *Pachycereus pringlei*, las flores masculinas pueden abortar antes o después de la meiosis, mientras que las flores

femeninas detienen su desarrollo después de la meiosis (Fleming *et al.*, 1994; Núñez, 2004). En las flores femeninas de *Mammillaria dioica*, la aborción del gineceo sucede al iniciar la meiosis (Sánchez, 2007) y en las flores femeninas de *Echinocereus yavapaiensis* las anteras abortan antes de la meiosis (Baker, 2006).

El papel de las hormonas en el desarrollo floral

-Las giberelinas (GAs) son un grupo de diterpenos que se sintetizan en tejidos jóvenes del tallo, frutos y semillas en desarrollo (Davies, 2004); controlan el crecimiento y la elongación, por expansión y división celular, en la iniciación floral y son esenciales para el desarrollo de los estambres y los pétalos. Asimismo se ha visto que los mutantes afectados en la síntesis de GAs tienen subdesarrollados los órganos florales. Por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* el mutante *ga-1-3* exhibe una reducida elongación de los pétalos, pistilo y filamentos, así como una reducción en la fertilidad del polen (Wilson *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 2004). Al contrario de las auxinas, las cuales tienen un papel clave en el desarrollo del patrón temprano del gineceo, las GAs tienen un papel tardío durante la elongación del fruto tras la fecundación (Vivian-Smith y Koltunow, 1999). Existe una comunicación entre las vías de señalización de ambas hormonas y se ha demostrado que las GAs pueden afectar la biosíntesis y el transporte de las auxinas (Ogawa *et al.*, 2003).

-Los jasmonatos (JAs) conforman un grupo de numerosos compuestos precursores o derivados del ácido jasmónico, los cuales son requeridos para la dehiscencia de la antera y la maduración del polen (McConn y Browse, 1996; Sanders *et al.*, 2000; Stintzi y Browse, 2000). Los mutantes de *A. thaliana* deficientes en respuesta a los JAs son estériles masculinos (Feys *et al.*, 1994) y la esterilidad causada por mutantes en la biosíntesis de JAs puede ser revertida por tratamientos con JAs (Stintzi y Browse, 2000). Además, el gen *AGAMOUS*, involucrado en la determinación de la identidad del meristemo floral (Yanofsky *et al.*, 1990), también controla el desarrollo final del estambre a través de la biosíntesis de JAs por la regulación directa de *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 (DAD1)*, que codifica la enzima biosintética de los JAs (Ito *et al.*, 2007).

-Los brasinoesteroides (BRs) estructuralmente son las hormonas más parecidas a las hormonas esteroides de los animales. Regulan la expresión de numerosos genes, contribuyendo a la regulación de la división y diferenciación celular, así como la expansión celular (Clouse, 2002). Diversos estudios han puesto de manifiesto la relación sinérgica entre las auxinas y los BRs (Hardtke, 2007; Hardtke *et al.*, 2007), los cuales controlan el desarrollo de la antera y del grano de polen. Se ha reportado que los mutantes de *A. thaliana* relacionado con la biosíntesis de los BRs *bri1*, *bin2* y *cpd* son estériles masculinos parciales ya que la cantidad de polen y su viabilidad se reduce, así como alteraciones en la liberación de los granos de polen (Ye *et al.*, 2010). Los BRs promueven el desarrollo de los estambres de las flores masculinas del maíz y se ha propuesto un papel activo en la activación de la degeneración de primordios del gineceo (Hartwig *et al.*, 2011).

-Las auxinas son fitorreguladores con funciones importantes en la elongación, división y diferenciación celular, así como en el modelaje de órganos, entre otras funciones (Ståldal *et al.*, 2008; Taiz y Zeiger, 2010). Las auxinas son importantes en el desarrollo del androceo, ya que en diferentes mutantes de *A. thaliana* (en los factores de respuesta a auxinas, *ARFs*) deficientes en respuesta a auxinas, muestran defectos en el desarrollo de los estambres (Ellis *et al.*, 2005; Nagpal *et al.*, 2005). Además la síntesis de auxina en las anteras es importante para la maduración del polen y la dehiscencia de la antera (Cecchetti *et al.*, 2008). En mutantes de *A. thaliana*, existen defectos en el desarrollo del gineceo causados por disturbios en la biosíntesis de auxinas, su transporte o la señalización. La inhibición química del transporte polar de auxinas conduce a un patrón apical-basal alterado del gineceo, trayendo como consecuencia que la región apical del gineceo y el ginóforo (porción alargada del receptáculo o del eje de algunas flores en cuyo ápice se dispone el gineceo, Fig. 1A) se amplíen y el tamaño del ovario se reduzca (Okada *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1995; Sesseions *et al.*, 1997; Ståldal *et al.*, 2008; Fig. 1C). Nemhauser *et al.* (2000) sugirieron un modelo de patrón apical-basal del gineceo, donde se extiende un gradiente de auxinas en el primordio del gineceo de *A. thaliana*. Los autores proponen que los altos niveles de auxinas en la región apical promueven la diferenciación y proliferación del estilo y el estigma. Mientras que en el ovario los niveles de auxinas son intermedios y en el ginóforo son bajos (Fig. 1B). En el caso de los dobles mutantes de *sty1-1 sty2-1* de *A. thaliana*, cuando los

niveles de auxinas endógenas son bajos, hay reducción del gineceo, pero la aplicación exógena de auxinas revierte algunos de los defectos del estilo. Se ha propuesto que *STY1* actúa como un factor transcripcional en la vía de la biosíntesis de auxinas (Cheng *et al.*, 2006; Sohlberg *et al.*, 2006; Ståldal *et al.*, 2008).

En estudios anteriores sobre *O. stenopetala*, se logró amplificar un fragmento del gen ortólogo a *STY*, nombrándolo *OstSTY* (Orozco, 2012). El gen *STY* es importante para la correcta diferenciación de los patrones del tejido del estilo, del estigma y del tejido de transmisión durante el desarrollo del órgano reproductor femenino en *A. thaliana* (Kuusk *et al.*, 2002).

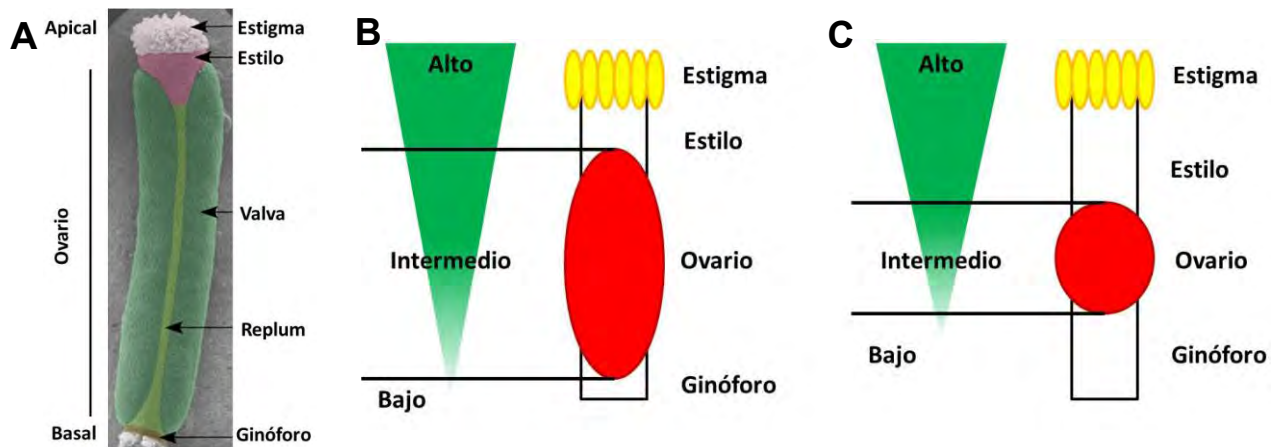


Figura 1. Morfología del gineceo y modelo del gradiente de auxinas en *Arabidopsis thaliana*. **A)** Morfología del gineceo. **B)** Patrón del gradiente apical-basal de auxinas. **C)** Patrón del gradiente de auxinas inhibido. La figura **A** es tomada de Krizek (2011) y las figuras **B** y **C** son modificadas de Sundberg y Ostergaard (2009).

Orozco-Arroyo *et al.* (2012) encontraron un incremento notable en el transcrito de *OstSTY* en el gineceo de las flores femeninas con respecto a las masculinas. También, se demostró que el gineceo de la flor masculina presenta una notable reducción del ácido indol-3-acético (AIA) en los primeros estados del desarrollo. Sin embargo en un estado intermedio del desarrollo, e incluso en la antesis, el nivel de AIA fue similar para el gineceo de ambos tipos florales, sugiriendo que un mayor nivel del transcrito de *OstSTY* en el gineceo de flores femeninas se correlaciona con una mayor cantidad de auxina en sus tejidos.

En estudios anteriores sobre *O. stenopetala* (Orozco-Arroyo *et al.*, 2012) se aplicaron exógenamente auxinas como el ácido 1-naftalen acético (ANA) al gineceo de flores masculinas en diferentes etapas del desarrollo. Los resultados que se obtuvieron en los gineceos de flores masculinas en etapas tempranas del desarrollo, indican que se promueve el desarrollo de papilas estigmáticas y el incremento en el tejido de transmisión (tejido por el cual crecen los tubos polínicos) del estilo (Fig. 2).

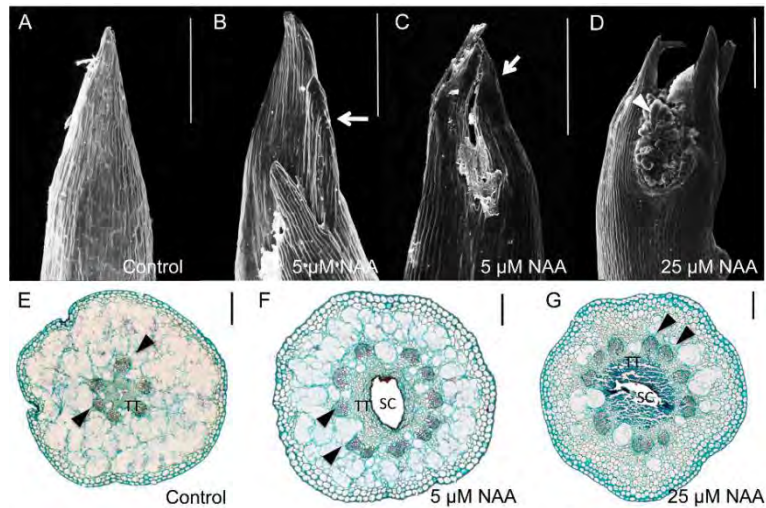


Figura 2. La aplicación exógena de auxinas a diferentes concentraciones revierten parcialmente algunos defectos del gineceo en *O. stenopetala*. **A** y **E**. Fenotipo masculino sin tratamiento de ANA. **B**, **C** y **F**. Tratamiento con 5 μM de ANA. **D** y **G**. Tratamiento con 25 μM de ANA. Se puede observar que los gineceos con el tratamiento a 25 μM tiene una mayor restauración, ya que se presenta un desarrollo de papilas estigmáticas (**D**). SC, canal estilar; TT, tejido de transmisión. Las flechas señalan estructuras similares a lóbulos estigmáticos; la cabeza de flecha blanca señala a las papilas estigmáticas; las cabezas de flecha negras indican la ubicación de los haces vasculares (tomado de Orozco-Arroyo *et al.*, 2012).

Sin embargo, en este estudio previo no comprobamos si el estigma y el estilo recuperados son funcionales. Desconocíamos si esas papilas estigmáticas en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*, cuyo desarrollo es provocado por la aplicación exógena de auxinas, son capaces de promover la adherencia, hidratación y germinación de granos de polen. Tampoco analizamos el crecimiento de tubos polínicos en los estilos revertidos y con mayor desarrollo de tejido de transmisión, ni tampoco si esos tubos polínicos son capaces de llegar al ovario para encontrarse con los óvulos y efectuar la fecundación. Todas estas interrogantes son abordadas en la presente investigación. Asimismo se planteó conocer el efecto que provocan las auxinas al ser aplicadas exógenamente de forma directa en ovarios jóvenes de flores masculinas.

HIPÓTESIS

Si las auxinas juegan un papel importante en el patrón del desarrollo del gineceo, entonces la aplicación exógena de auxinas revertirá algunos de los defectos en el ovario y volver funcionales al estigma y al estilo del morfo masculino de *Opuntia stenopetala*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los efectos causados por la aplicación exógena de diferentes concentraciones de auxinas en el gineceo de la flor masculina de *O. stenopetala*.

Objetivos particulares:

- 1) Caracterizar los cambios morfológicos que se presentan a nivel del estigma, del estilo, del ovario y de los óvulos, como respuesta a la aplicación exógena de auxinas en las flores masculinas de *O. stenopetala*
- 2) Analizar la anatomía del estigma, del estilo y de los óvulos en las flores masculinas de *O. stenopetala* después de la aplicación exógena de auxinas.
- 3) Evaluar si los estigmas formados por la aplicación exógena de auxinas en las flores masculinas en etapas tempranas del desarrollo permiten la germinación de los granos de polen y si éstos crecen a través del estilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio. *Opuntia stenopetala* Engelm (Bravo-Hollis, 1978; Scheinvar, 2004). *Arbusto* rastrero ligeramente ascendente, con frecuencia formando matorrales. *Tronco* no definido. *Cladodios* de color verde grisáceo, a veces purpúreos, oblongos u obovados, de 10 - 25 cm de longitud. *Aréolas* elípticas a ovales, dispuestas en ca. 8 series, distantes entre sí de 1 - 3 cm, con tricomas blancos que cambian a negro con el tiempo. *Espinas*, cuando se presentan, 2 a 6, ausentes en las aréolas inferiores, grises, de 2 - 5 cm de longitud, la principal algo aplanada. *Glóquidas* morenas muy abundantes en los artículos jóvenes. *Flores*, unisexuales, de 2.5 - 3.2 cm de longitud. *Pericarpelo* rugoso, verde grisáceo con tintes rojizos, provisto de aréolas. *Segmentos del perianto* angostos, acuminados, rojo anaranjado. *Estambres* anaranjados, abortivos en la flor femenina y fértiles en la flor masculina. *Estilo* grueso y anaranjado en la flor femenina; lóbulos del estigma de 8 - 9, amarillos; el estilo es abortivo en la flor masculina. *Fruto* rojo, de 5 cm de longitud y 4.5 cm de ancho, con aréolas pequeñas. *Semillas* pequeñas, lisas, de 3 mm de espesor, con margen amplio, discoideas, color moreno amarillento.

Distribución: Estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, Querétaro, Guanajuato e Hidalgo.

Fenología: de acuerdo con la revisión de ejemplares de herbario realizado por Orozco (2002) y observaciones realizadas durante la presente investigación, *O. stenopetala* florece desde el mes de marzo hasta junio y se pueden encontrar frutos a partir de julio.

Sitio de colecta. El material biológico de *O. stenopetala* fue recolectado en dos localidades ubicadas en el Municipio de Cadereyta, Querétaro. Dichas localidades se encuentran sobre la carretera que va de Cadereyta a Vizarrón, cerca de la desviación a Bellavista. La primera se localiza en el km 11 y la segunda en el km 17. El suelo de estas localidades corresponde al tipo rocoso calcáreo. El tipo de vegetación corresponde a matorral rosetófilo con *Hechtia*, *Dasilyrion* y *Agave*. Se realizaron tres recolectas (en abril del 2010, en mayo del 2011 y en marzo del 2012).

Colecta del material. Se realizó un transecto (100 m por 20 m) por cada localidad elegida. Posteriormente se procedió a la localización de individuos de *O. stenopetala* en cada transecto, que tuvieran flores en antesis y botones florales. Para determinar el sexo de cada planta se disectaron flores en antesis o botones florales de etapa avanzada y se revisaron los ovarios y estilos para conocer si producían óvulos y/o tejido estigmático respectivamente.

Después de determinar el sexo de las plantas, se colectaron cladodios de individuos masculinos y femeninos con botones florales en distintas etapas de desarrollo, sobre todo tempranas e intermedias. También se colectaron cladodios con flores en antesis, los cuales se trasladaron en el 2010 al invernadero de la Facultad de Química en el Conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el 2011 y 2012 en un invernadero particular del Distrito Federal.

Tratamientos. Posteriormente, los botones florales se separaron de acuerdo al diámetro mayor en la parte media del botón y se aplicaron exógenamente un tratamiento con auxina (ácido 1-naftaleno acético, ANA) y un tratamiento con el inhibidor del transporte de auxinas (Naptalam, NPA), así como los controles a los botones florales que midieron menos de un centímetro (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos y controles.

Tratamientos	Concentraciones	
Auxina (ácido 1-naftaleno acético, ANA)	5µM*	25µM*
Inhibidor (Naptalam, NPA)	10µM**	
Controles		
Control 1	Sin aplicación	
Control 2	Dimetilsulfóxido, (DMSO), sustancia donde se disuelve la auxina	
Control 3	Agua destilada donde se disuelve el Naptalam	

* Estas concentraciones se tomaron del estudio anteriormente realizado en las flores masculinas de *O. stenopetala*, con las cuales se obtuvieron resultados satisfactorios, como promover el desarrollo de papilas estigmáticas y un incremento en el tejido de transmisión del estilo (Orozco-Arroyo *et al.*, 2012). ** Modificado de Sohlberg *et al.* (2006).





Cada tratamiento se inyectó con jeringas para insulina (de marca comercial). En el 2010 cada tratamiento se aplicó una sola vez, pero en el 2011 cada tratamiento se aplicó tres

veces, con una diferencia de 48 h entre cada inyección. La aplicación se realizó a la altura del ovario (50 µl en cada inyección del tratamiento correspondiente). Los cladodios con los botones tratados se mantuvieron hidratados (en charolas con agua) en condiciones de invernadero durante 10 días. El número total de botones florales y flores en antesis tratadas en el 2010 y en el 2011 se muestran en la tabla 2.

Prueba para determinar la funcionalidad de los estigmas. Para evaluar si los estigmas formados por la aplicación exógena de auxinas en las flores masculinas permiten la germinación de los granos de polen y si éstos crecen a través del estilo hasta el ovario. Se llevó a cabo la microaplicación de auxina (ANA) disuelta en DMSO en una concentración a 25 µM, añadida con lanolina con 2.5 % de parafina líquida, para crear una pasta de consistencia suave y evitar el escurrimiento de la auxina, sobre los estilos en desarrollo. El tratamiento control consistió sólo en la adición de DMSO a la lanolina con 2.5 % de parafina líquida. A los botones florales en etapas de desarrollo temprano se les removió la parte apical de los tépalos para exponer el estilo. La pasta de lanolina-ANA y la del control se aplicó en la parte apical del estilo con la ayuda de una espátula, los estilos se cubrieron con los restos del perianto previamente removido. Los cladodios con los botones tratados se mantuvieron hidratados en charolas con agua en condiciones de invernadero. Posteriormente después de siete días de aplicados los tratamientos, algunas de estas flores se polinizaron manualmente con granos de polen de flores masculinas no tratadas. El número total de botones florales y flores en antesis tratadas en el 2012 se muestran en la tabla 2.

Análisis morfológico e histológico de los gineceos de ambos morfos florales. Para conocer el efecto de los tratamientos se realizó un análisis morfo-anatómico de los botones florales y flores tratadas, los cuales se fijaron en FAA. Para eliminar el exceso de fijador de las muestras, éstas se lavaron con agua haciendo dos cambios de 10 minutos cada uno y se deshidrataron hasta alcohol al 70%. El material se analizó con el microscopio estereoscópico y se seleccionaron al menos 10 muestras de cada tratamiento para ser preparados y observados en el microscopio electrónico de barrido (MEB); mientras otra parte se incluyó en LR-White y en Paraplast. Para deshidratar los tejidos, éstos se pasaron por etanoles graduales (70 %, 85 %, 96 %, 100 % y 100 %) de 45 minutos a una hora en cada uno.

Tabla 2. Número de botones tratados.

Sexo Tratamiento	 T1*	 T2**	 T3***	
	Analizados/Tratados			
Una sola inyección de los tratamientos (2010)				
ANA 5 µM	30/34	30/41	0/0	20/48
ANA 25 µM	30/41	30/39	0/0	20/47
NPA 10 µM	30/30	30/36	0/0	20/33
Control 1 sin aplicar	30/35	30/30	0/0	20/22
Control 2 DMSO	30/34	30/30	0/0	20/20
Control 3 agua destilada	30/30	30/32	0/0	20/23
Tres inyecciones de los tratamientos (2011)				
ANA 5 µM	20/20	20/27	12/18	18/18
ANA 25 µM	20/22	20/30	12/22	18/22
NPA 10 µM	20/20	20/20	12/14	18/20
Control 1 sin aplicar	20/25	20/20	12/12	18/18
Control 2 DMSO	20/20	20/22	12/16	18/20
Control 3 agua destilada	20/24	20/23	12/12	18/18
Microaplicación disuelto en lanolina (2012)				
ANA 25 µM	25/30	25/30	25/30	25/30
Control DMSO	25/30	25/30	25/30	25/30

*T1 fenotipo del ovario que presenta pocos óvulos inmaduros en las flores masculinas. **T2 fenotipo del ovario sin óvulos en las flores masculinas. ***T3 fenotipo sin ovario en las flores masculinas.

-Inclusión en Paraplast. Después de la deshidratación, el material se pasó inicialmente en xilol por 15 minutos y posteriormente por mezclas de xilol-paraplast en proporciones 1:1 durante 12 h como tiempo mínimo y 24 h como máximo dentro de una estufa a una temperatura entre 55 y 60 °C. Posteriormente las muestras se impregnaron con paraplast puro durante 24 h y se incluyeron en paraplast puro en moldes metálicos. Se obtuvieron cortes de 7 – 10 µm de grosor en un micrótopo de rotación American Optical 820. Los cortes

se desparafinaron durante una hora en una estufa a una temperatura entre 55 - 60 °C y se pasaron por tres cambios de xilol, por un cambio en la mezcla de xilol-etanol absoluto (1:1) y se hidrataron hasta etanol al 96 % durante tres minutos en cada uno. Posteriormente se tiñeron con safranina-verde rápido en metilcelosolve (López *et al.*, 2005).

-Inclusión en LR-White. Después de la deshidratación, las muestras se colocaron en una mezcla de resina LR-White-etanol absoluto (1:1) durante 24 h. Posteriormente se impregnaron en LR-White puro durante 24 h. La polimerización se llevó a cabo en ausencia de oxígeno en cápsulas de gelatina en una estufa a 56 °C. Se realizaron cortes de 1-1.5 µm de grosor en un ultramicrotomo JMC-MT 990 con cuchillas de vidrio, los cortes se tiñeron con azul de toluidina 1% (López *et al.*, 2005). Los cortes obtenidos de ambas técnicas, se observaron por microscopía fotónica en el microscopio Olympus Provis AX70 y se tomaron fotografías.

-Microscopía electrónica de barrido. Para conocer el efecto de los tratamientos en el desarrollo del gineceo, se disectaron total o parcialmente botones y flores, removiendo las unidades del perianto. Después de llevar a cabo la deshidratación en etanoles graduales, se procesó el material en una desecadora de punto crítico con CO₂ CPD-030 Bal-Tec. Este material se montó en portamuestras metálicos sobre cinta conductora de carbón y se cubrieron con oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk-II, para posteriormente ser observados en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV. Del material observado se tomaron fotografías.

Observación de tubos polínicos. De flores masculinas cuyos estilos fueron tratados con auxina (ANA) en lanolina y de los controles (sólo DMSO-lanolina) que fueron polinizadas manualmente, se disectaron los gineceos y se fijaron en FAA después de 24, 48 y 72 horas post-polinización. A continuación, se lavaron con agua destilada y se pusieron en una solución de NaSO₃ y se colocaron en una autoclave (STEAM STERILIZER, modelo: STE-18A-16L) manteniéndola a 134 °C y 2.1 bar por 15 minutos. Para evidenciar tubos polínicos el material se lavó con agua destilada y se colocó en azul de anilina decolorado al 1 % en K₃PO₄ 0.1N durante toda la noche en oscuridad a 4 °C. En seguida, los gineceos se

aplastaron entre un portaobjeto y un cubreobjeto, estas preparaciones se sellaron con barniz de uñas y se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus Provis AX750 para evidenciar la calosa de los tubos polínicos.

Análisis estadísticos. Para las flores tratadas con inyección. Los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar de la media. En cuanto al número de óvulos desarrollados en cada tratamiento (sin aplicar, DMSO, H₂O, 5 μ M ANA, 25 μ M ANA y 10 μ M de NPA) se les aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Posteriormente se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (dado que los datos no se distribuyeron de manera normal y homogénea) con una prueba de comparación múltiple de Dunn para la comparación de las medias de cada tratamiento. Para las flores tratadas con lanolina, los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar de la media. A los datos de número de óvulos que se presentan en cada tratamiento (DMSO y 25 μ M ANA) se les aplicó *t-tests*.

RESULTADOS

Una sola aplicación exógena de auxina (ANA) a nivel del ovario

En estos experimentos, el ANA disuelto en DMSO se inyectó directamente en el ovario de botones florales masculinos y femeninos **sólo una vez**. Los controles consistieron en 1) no aplicar inyección y 2) en inyectar únicamente DMSO una vez.

Flores masculinas del tipo 1.

Son flores que generalmente presentan sólo óvulos inmaduros en la base del ovario. Los ovarios del tratamiento control sin aplicar (n= 30), mostraron un promedio de óvulos por ovario de 3.96 ± 0.41 . Con respecto al desarrollo de los óvulos, el 10 % de los ovarios analizados no presentaron óvulos; el 77 % desarrollaron primordios ovulares, los cuales son nucelas aplanadas y alargadas (sin mayor diferenciación), en otras ocasiones estos primordios ovulares llegaron a formar primordios del tegumento interno, mientras que el último 13 % presentaron sólo crecimiento del funículo (Fig. 3J). A las flores que se les aplicó únicamente **DMSO** (n= 30), no tuvieron cambios significativos en el promedio de óvulos (3.76 ± 0.48) ni en el desarrollo de éstos (Fig. 3B, J) cuando fueron comparados con los óvulos de las flores sin tratamiento.

Sin embargo, en los ovarios tratados con **5 μ M de ANA** (n= 30), se incrementó el número de óvulos por ovario, con un promedio de 8.83 ± 1.28 . Estos óvulos adicionales se desarrollaron a partir de las paredes laterales del ovario (placentación parietal, Fig. 3C). Con respecto al desarrollo de dichos óvulos, un 33 % de los ovarios observados presentaron óvulos con un crecimiento del funículo y un 10 % desarrolló un óvulo con un funículo que empezó a envolverlo (Fig. 3D, J). La adición de **25 μ M de ANA** (n= 30), además de un incremento en el número de óvulos (Fig. 3E, G), con un promedio de 7.46 ± 0.86 , provocó un mayor crecimiento y diferenciación de los óvulos (Fig. 3F, H). Un 23 % de los ovarios analizados mostraron óvulos con un crecimiento del funículo y un 40 % desarrolló un funículo que envuelve casi al resto del óvulo y su morfología externa se asemejó a la observada en óvulos maduros de flores femeninas (Fig. 3E-H, J); sin embargo, el número de óvulos en flores femeninas fue alto y tuvieron mayor diferenciación (Fig. 3I).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 23.08$; $P= 0.0001$, Fig. 3A). Con la prueba de comparación múltiple de Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 5 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -30.45), sin aplicar vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -27.85), DMSO vs. 5 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -32.68) y DMSO vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -30.08).

Flores masculinas del tipo 2.

Son las flores que generalmente no presentan óvulos (en promedio de 0.36 ± 0.18 óvulos, Fig. 4B). El 87 % de los ovarios del tratamiento control sin aplicar ($n= 30$) no tuvieron óvulos y el 13 % presentaron primordios de óvulos, los cuales formaron sólo nucelas aplanadas y muy rara vez se llega a la iniciación del tegumento interno (Fig. 4G). A las flores que se les aplicó solamente **DMSO** ($n= 30$), no mostraron cambios significativos en el promedio de óvulos (0.33 ± 0.19) ni en el grado del desarrollo del ovario (Fig. 4G) en comparación con los ovarios de las flores sin tratamiento.

No obstante, en los ovarios que se les aplicó **5 μM de ANA** ($n= 30$), se observó la presencia de primordios ovulares en la base del ovario, con un promedio de 3.43 ± 0.95 . En algunos casos, los óvulos llegaron a etapas de mayor desarrollo. Después de este tratamiento el 53 % de los ovarios examinados no presentaron óvulos; el 30 % presentaron primordios ovulares, de los cuales algunos tuvieron un inicio de desarrollo aparentemente normal, incluso en algunos óvulos se observó el desarrollo del tegumento interno (Fig. 4D). Además el 17 % tuvo un crecimiento mayor del funículo (Fig. 4C, G). En la concentración a **25 μM de ANA** ($n= 30$), aparte de un incremento en el número de óvulos, con un promedio de 2.03 ± 0.41 (Fig. 4E), se observaron algunos óvulos con mayor desarrollo (Fig. 4F). El 50 % de los ovarios observados no formaron óvulos; un 27 % presentaron óvulos con crecimiento del funículo y un 10 % desarrolló un funículo muy largo que casi envuelve al resto del óvulo (Fig. 4F, G).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 21.54$; $P= 0.0001$, Fig. 4A). Con la prueba de comparación múltiple de

Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 5 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -23.77), sin aplicar vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -22.75), DMSO vs. 5 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -24.95) y DMSO vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -23.93).

Flores femeninas

En las flores femeninas los óvulos de ovarios no inyectados (n= 20, Fig. 5B, C) y tratados sólo con **DMSO** (n= 20) no mostraron cambios significativos entre sí. Sin embargo, comparados con los óvulos de las flores femeninas tratadas con las diferentes concentraciones de ANA (**5 μM** , n= 20 y **25 μM** , n= 20), se observó que algunos de estos últimos tuvieron un mayor crecimiento (Fig. 5D-G). El promedio de óvulos en flores no tratadas fue de 172.9 ± 9.74 , tratadas con sólo DMSO de 171.1 ± 5.79 , mientras que a las que se les aplicó las diferentes concentraciones de auxina: 5 μM 183.9 ± 6.64 y 25 μM 201.1 ± 7.69 .

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 9.44$; $P= 0.0239$, Fig. 5A). Con la prueba de comparación múltiple de Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -19.68).

FLORES MASCULINAS TIPO 1 + ANA (una aplicación)

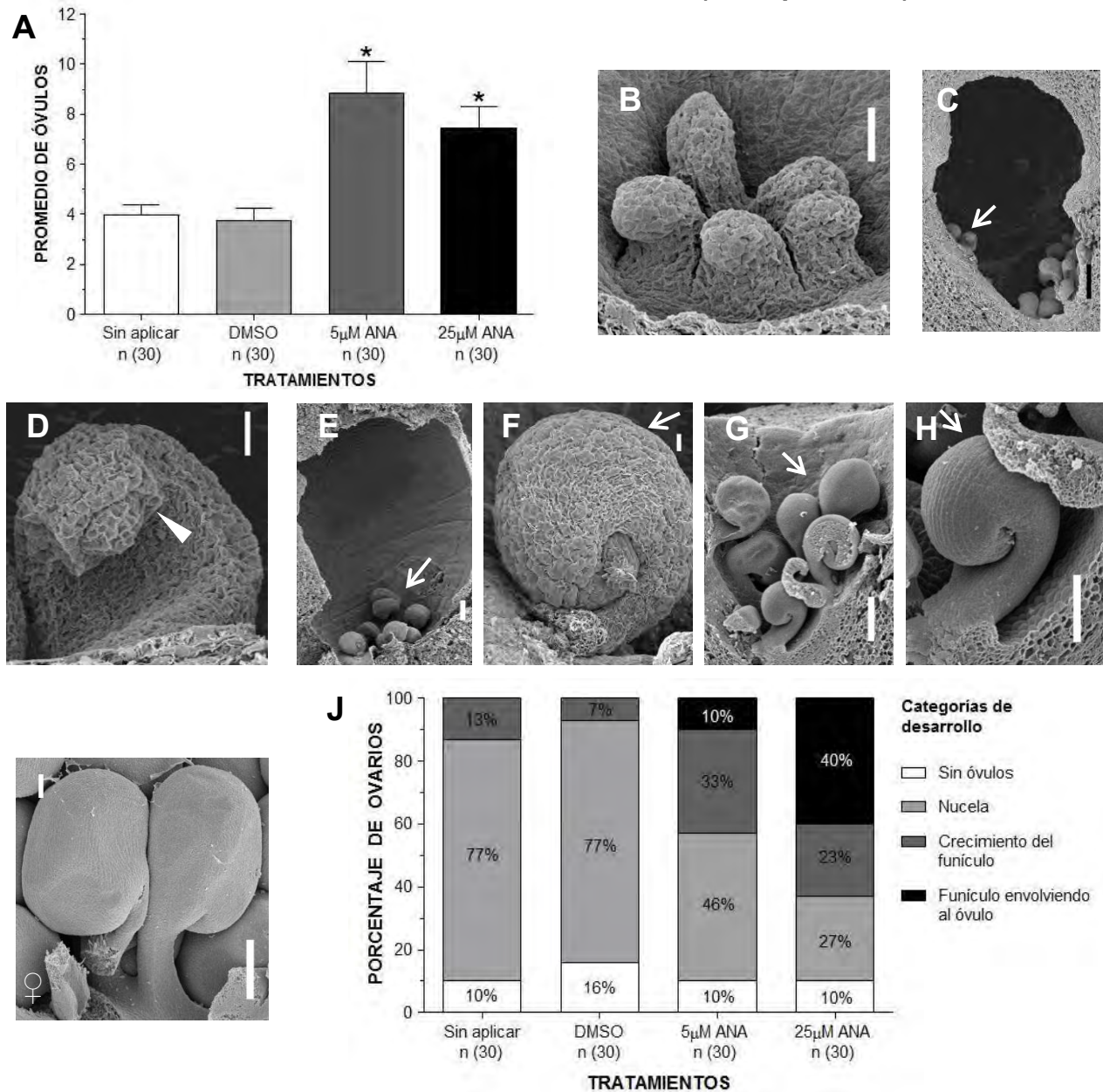


Figura 3. Flores masculinas del tipo 1 tratadas una vez con diferentes concentraciones de ANA. **A)** Promedio de óvulos por ovario de flores control y tratadas con distintas concentraciones de ANA. El * indica diferencia significativa con respecto a los controles ($K-W= 23.08$; $P= 0.0001$). **B)** Control con sólo DMSO. Algunos óvulos indiferenciados se desarrollaron en la base del ovario. **C)** Ovario tratado con 5 µM ANA. Los óvulos se desarrollan en la base del ovario y en la pared del ovario (flecha). **D)** Un acercamiento a óvulo tratado con 5 µM ANA, la cabeza de flecha muestra el inicio del tegumento interno. **E, G)** Ovarios tratados con 25 µM ANA. Las flechas muestran óvulos en crecimiento. **F, H)** Acercamiento a un óvulo de los paneles **E** y **G**, respectivamente, tratados con 25 µM ANA. El funículo (flecha) envuelve casi por completo al resto del óvulo. **I)** Óvulos maduros de flor femenina sin tratamiento alguno. **J)** Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo distintos tratamientos de ANA. Escalas: 40 µm (**B**), 200 µm (**C, E, G, I**), 20 µm (**D, F**), 100 µm (**H**).

FLORES MASCULINAS TIPO 2 + ANA (una aplicación)

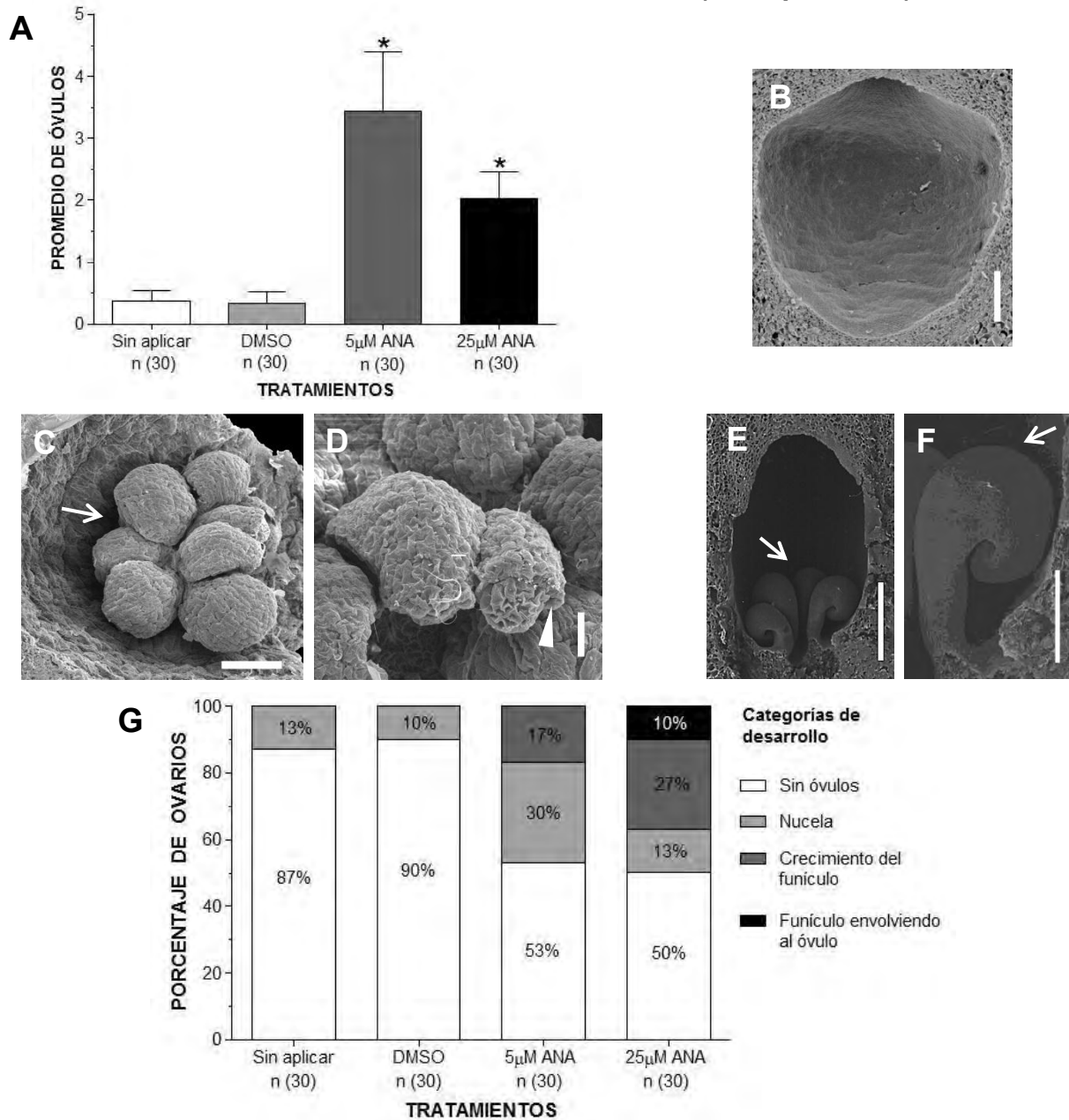


Figura 4. Flores masculinas del tipo 2 tratadas una vez con diferentes concentraciones de ANA. **A)** Promedio de óvulos por ovario de flores control y tratadas con distintas concentraciones de ANA. El * indican diferencia significativa con respecto a los controles ($K-W= 21.54$; $P= 0.0001$). **B)** Control sin tratar, se observa la cavidad del ovario sin óvulos. **C)** Ovario tratado con $5 \mu\text{M}$ ANA. La flecha muestra óvulos en desarrollo en la base del ovario. **D)** Óvulos tratados con $5 \mu\text{M}$ ANA, la cabeza de flecha muestra el inicio del tegumento interno. **E)** Ovario tratado con $25 \mu\text{M}$ ANA. La flecha muestra el desarrollo de óvulos. **F)** Óvulo tratado con $25 \mu\text{M}$ ANA. El funículo (flecha) envuelve casi al óvulo. **G)** Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo distintos tratamientos de ANA. Escalas: $200 \mu\text{m}$ (**B**, **F**), $100 \mu\text{m}$ (**C**), $30 \mu\text{m}$ (**D**), $500 \mu\text{m}$ (**E**).

FLORES FEMENINAS + ANA (una aplicación)

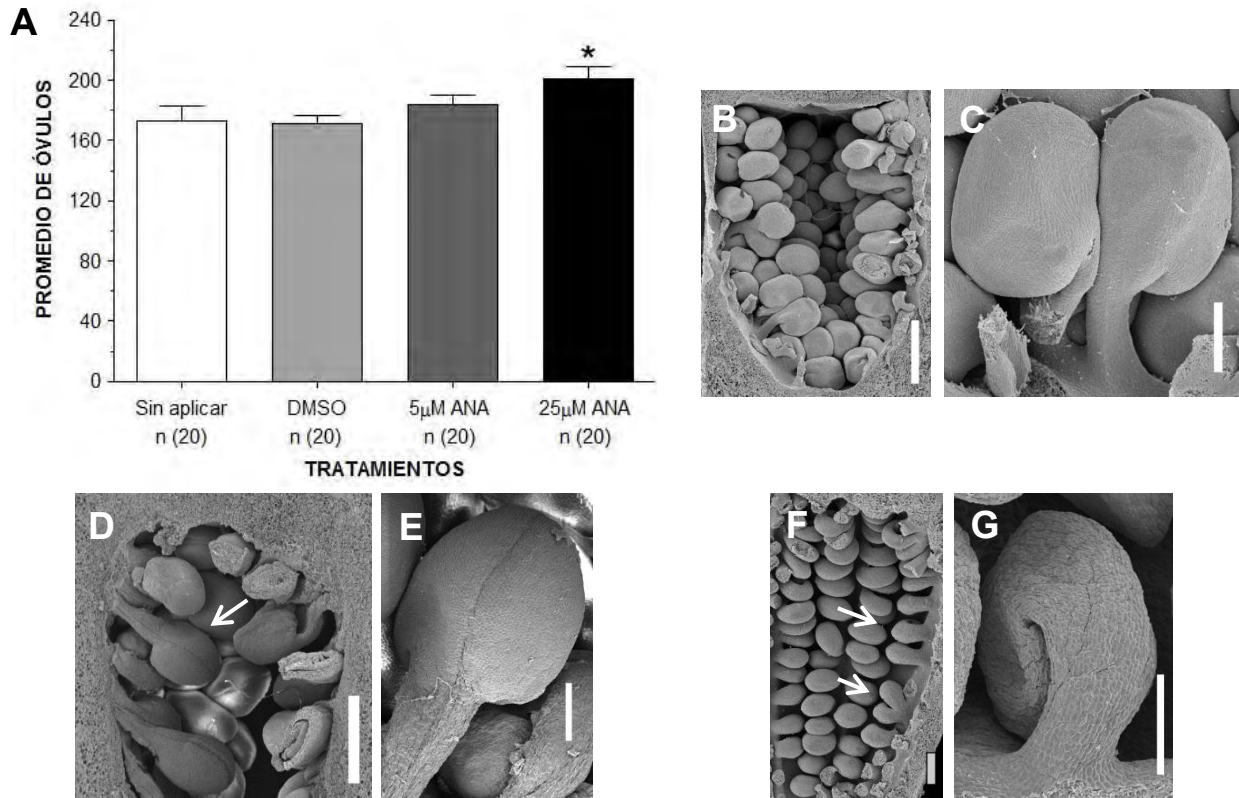


Figura 5. Flores femeninas tratadas una vez con diferentes concentraciones de ANA. **A)** Promedio de óvulos por ovario de flores control y tratadas con distintas concentraciones de ANA. El * indica diferencia significativa con respecto al control sin tratar ($K-W= 9.44$; $P= 0.0239$). **B)** Ovario de control sin tratar. **C)** Óvulo sin tratamiento. **D)** Ovario tratado con $5\mu\text{M}$ ANA. La flecha muestra un óvulo de mayor tamaño. **E)** Acercamiento a un óvulo tratado con $5\mu\text{M}$ ANA. **F)** Ovario tratado con $25\mu\text{M}$ ANA. Las flechas muestran óvulos. **G)** Óvulo tratado con $25\mu\text{M}$ ANA. Escalas: 1 mm (**B**, **D**), 200 μm (**C**, **E-G**).

Una sola aplicación del inhibidor del transporte de auxinas (Naptalam, NPA) a nivel del ovario

En estos experimentos, el inhibidor de auxinas NPA disuelto en agua destilada se inyectó directamente en el ovario de botones florales masculinos y femeninos **sólo una vez**. Los controles consistieron en 1) no aplicar ninguna inyección y 2) en inyectar solamente agua destilada una vez.

Flores masculinas del tipo 1

Son flores que por lo general exhiben sólo óvulos inmaduros en la base del ovario. En las flores a las que se les aplicó solamente **agua destilada** ($n= 30$), no se detectaron cambios ni en el desarrollo ni en el promedio de óvulos 3.56 ± 0.52 , en comparación con las que no

fueron inyectadas (n= 30), con un promedio de 3.96 ± 0.41 (Fig. 6B, F). Sin embargo, en los ovarios tratados con **10 μM de NPA** (n= 30), se observó una reducción en el promedio de óvulos 2.33 ± 0.48 en comparación a los controles (sin aplicar y sólo H₂O), así como en el tamaño del ovario. Un 47 % de los ovarios examinados no formaron óvulos; el 43 % presentaron nucelas aplanadas, mientras que el último 10 % tuvo además un crecimiento del funículo (Fig. 6C-F).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 6.76$; $P= 0.033$, Fig. 6A). Con la prueba de comparación múltiple de Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 10 μM NPA (diferencia de suma de rangos= 17.08).

Flores masculinas del tipo 2

Son las flores que generalmente no tienen óvulos. Las flores tratadas únicamente con **agua destilada** (n= 30), no presentaron cambios en el desarrollo del ovario ni en el promedio de óvulos (0.3 ± 0.15), en comparación con las que no fueron inyectadas (n= 30), con un promedio de 0.36 ± 0.18 (Fig. 7A, B). Por otra parte, en los ovarios que se trataron con **10 μM de NPA** (n= 30) se observó una ligera reducción en el promedio de óvulos (0.2 ± 0.14) la cual no es estadísticamente significativa, en comparación con los controles (sin aplicar y únicamente H₂O). Sin embargo, el tamaño del ovario fue de menor dimensión (Fig. 7C, D). Un 93 % de los ovarios examinados no formaron óvulos y el 7 % restante presentaron primordios de óvulos, los cuales son nucelas aplanadas y alargadas (Fig. 7A).

Flores femeninas

En las flores femeninas con aplicación de **10 μM de NPA**(n= 20), se observó una reducción en el promedio de óvulos (160.6 ± 7.93) en comparación con los controles: sin aplicar (n= 20, 172.9 ± 9.74) y solamente H₂O (n= 20, 173.2 ± 7.66), sin llegar a ser estadísticamente significativa; en ocasiones hay una ligera reducción en el tamaño de los óvulos (Fig. 8A-E).

FLORES MASCULINAS TIPO 1 + NPA (una aplicación)

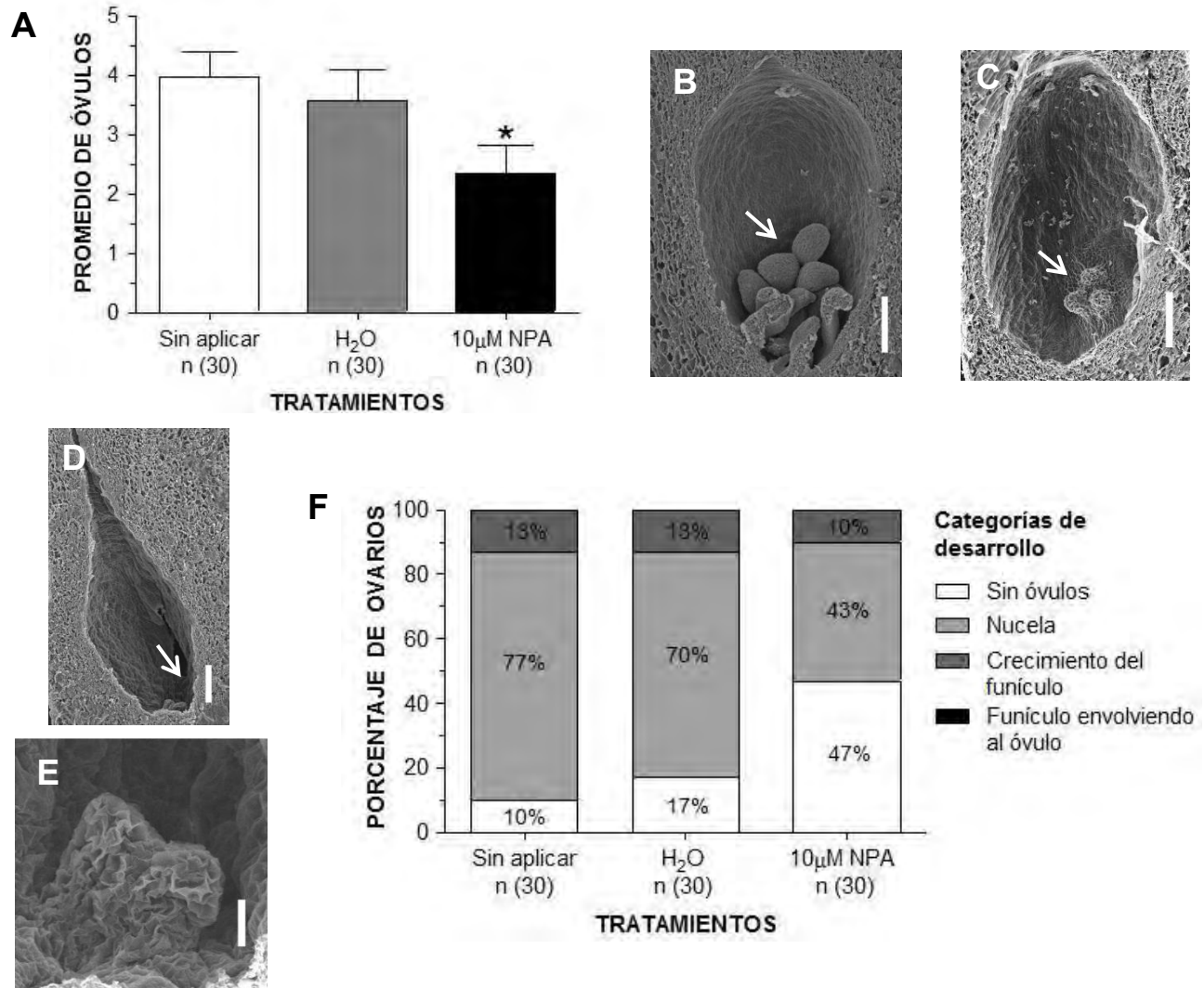
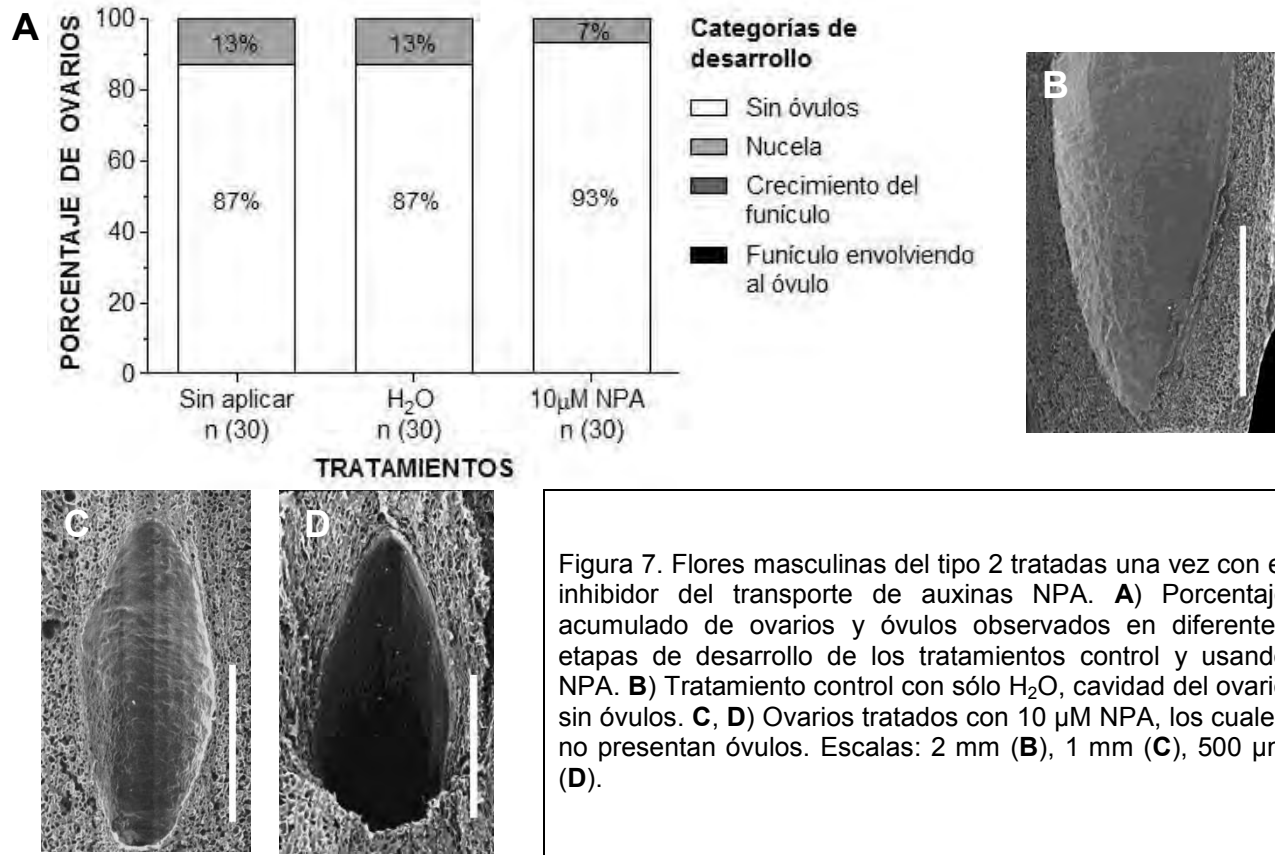
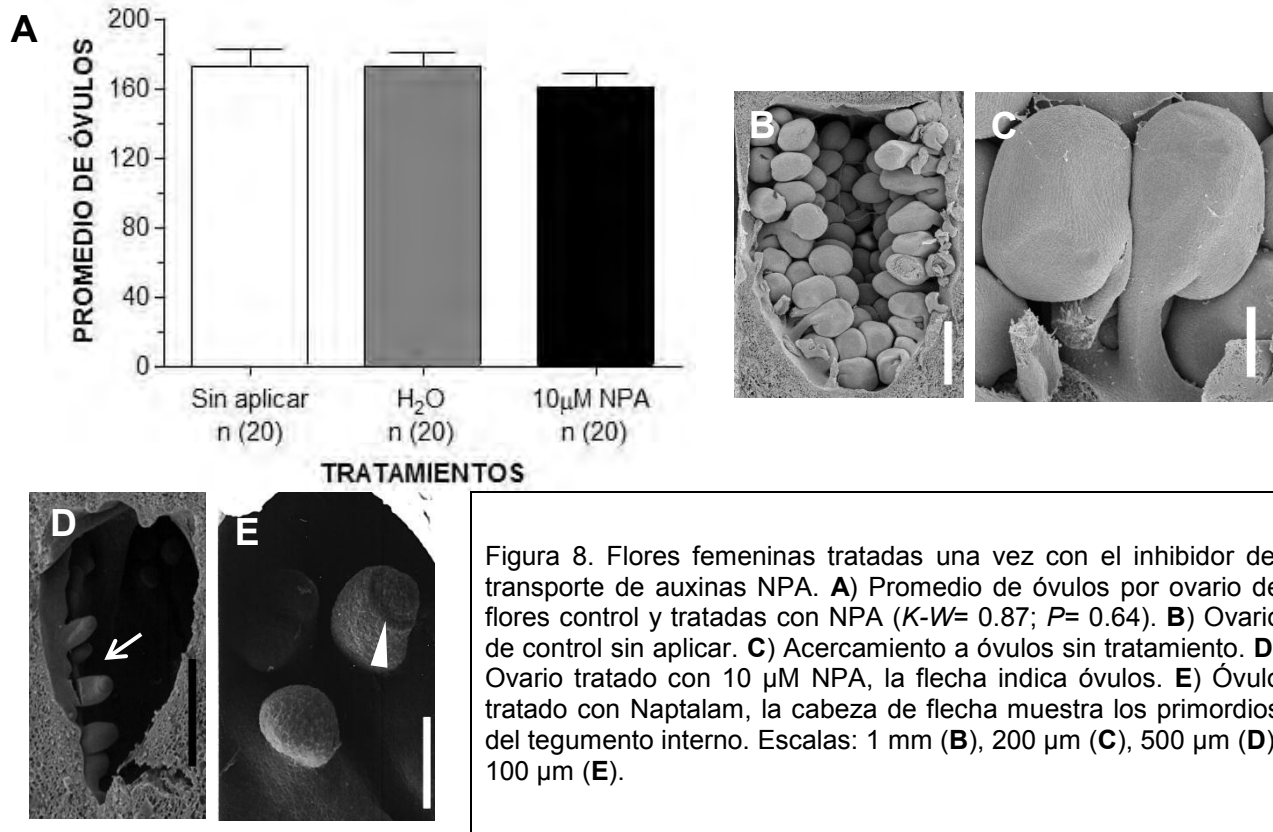


Figura 6. Flores masculinas del tipo 1 tratadas una vez con el inhibidor del transporte de auxinas NPA. **A)** Promedio de óvulos por ovario en flores control y tratadas con el inhibidor del transporte de auxinas NPA. El * indica diferencia significativa con respecto al control sin tratar ($K-W=6.76$; $P=0.033$). **B)** Tratamiento control con sólo H₂O. La flecha indica óvulos. **C, D)** Ovarios tratados con 10 µM NPA. Las flechas muestran primordios de óvulos. **E)** Primordios de óvulos tratados con 10 µM NPA. **F)** Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo el inhibidor del transporte de auxinas NPA. Escalas: 200 µm (**B**), 100 µm (**C, D**), 20 µm (**E**).

FLORES MASCULINAS TIPO 2 + NPA (una aplicación)



FLORES FEMENINAS + NPA (una aplicación)



Tres aplicaciones exógenas de auxina (ANA) a nivel del ovario

En estos experimentos, el ANA disuelto en DMSO se inyectó directamente en el ovario de botones florales masculinos y femeninos en **tres ocasiones** con una diferencia de 48 h entre cada inyección. Los controles consistieron en 1) no aplicar ninguna inyección y 2) en inyectar solamente DMSO en tres ocasiones.

Flores masculinas del tipo 1

A las flores que presentan generalmente óvulos inmaduros en la base del ovario se les aplicó sólo **DMSO** ($n= 20$), pero no mostraron cambios en el promedio de óvulos (5 ± 0.79) ni en el desarrollo de éstos (Fig. 9B, C, I), en comparación con las que no fueron inyectadas ($n= 20$), con un promedio de 5.25 ± 0.79 . En los ovarios que se trataron con **5 μ M de ANA** ($n= 20$), se observó un aumento en el número de óvulos, con un promedio de 7.65 ± 0.93 . Los óvulos adicionales se desarrollaron a partir de las paredes laterales del ovario (Fig. 9D, E). Un 40 %

de los ovarios observados presentaron óvulos con un crecimiento del funículo y un 25 % desarrolló un funículo que empezó a envolver al resto del óvulo (Fig. 9I). A una concentración de **25 μ M de ANA** (n= 20), hubo un mayor número de óvulos, con un promedio de 17.75 ± 4.67 (Fig. 9H, F). El 30% de los ovarios revisados presentaron óvulos con crecimiento del funículo y el 45 % desarrolló un funículo que envuelve casi al resto del óvulo y su morfología externa se asemeja a la observada en óvulos maduros de flores femeninas (Fig. 9G, I).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 13.72$; $P= 0.0033$, Fig. 9A). Con la prueba de comparación múltiple de Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 25 μ M ANA (diferencia de suma de rangos= -21.68) y DMSO vs. 25 μ M ANA (diferencia de suma de rangos= -23.08).

Flores masculinas del tipo 2

A las flores que generalmente no presentan óvulos se les aplicó sólo **DMSO** (n= 20), pero no mostraron cambios significativos en el promedio de óvulos (0.75 ± 0.36) ni en el desarrollo del ovario, en relación con las que no fueron inyectadas (n= 20), con un promedio de 0.8 ± 0.34 (Fig. 10B, I). Sin embargo, en los ovarios que se trataron con **5 μ M de ANA** (n= 20), se observó la presencia de primordios ovulares y algunos óvulos con mayor desarrollo, con un promedio de 3.4 ± 0.69 óvulos por ovario (Fig. 10C, D). Un 40 % de los ovarios estudiados no formaron óvulos, el 35 % presentaron primordios ovulares, en algunos se observó el desarrollo del tegumento interno y el último 25 % tuvo un crecimiento del funículo (Fig. 10I). Con la aplicación de **25 μ M de ANA**(n= 20) el 35 % de los ovarios analizados no tuvieron óvulos, el resto presentó un aumento en el número de óvulos, con un promedio de 4.4 ± 1.05 (Fig. 10E), de los cuales el 20 % alcanzó un desarrollo hasta nucela, mientras que un 30 % presentó óvulos con crecimiento del funículo y el 15 % desarrolló un funículo muy largo que casi envuelve al resto del óvulo (Fig. 10E-I).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 17.52$; $P= 0.0006$, Fig. 10A). Con la prueba de comparación múltiple de Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 5 μ M ANA (diferencia de suma de rangos= -18.15), sin aplicar vs. 25 μ M ANA (diferencia de suma de rangos= -19.95),

DMSO vs. 5 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -19.05) y DMSO vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -20.85).

Flores masculinas del tipo 3

Son flores que generalmente no exhiben cavidad del ovario y al no ser inyectadas (n= 12), se encontró que 50 % de las flores examinadas no presentan ovario (sólido), en un 25 % sólo perduró una ligera abertura semejante a una cicatriz (cavidad casi cerrada), el 17 % presentó un ovario reducido sin óvulos, el último 8 % (que equivale a un sólo ovario), presentó 3 primordios ovulares, los cuales son nucelas aplanadas (Fig. 11A). A las flores que se les aplicó sólo **DMSO** (n= 12), no tuvieron cambios significativos en el desarrollo del ovario comparadas con las no inyectadas (Fig. 11A, B). Sin embargo, en las flores tratadas con **5 μM de ANA** (n= 12), se observó que un 58 % de las flores analizadas no presentaron ovario, en un 25 % sólo perduró una reducida cavidad y el 17 % restante presentó un ovario reducido (Fig. 11A). Con la aplicación de **25 μM de ANA** (n= 12), un 33 % de las flores no exhibieron ovario, el 25 % sólo presentó una sutil abertura, otro 25 % presentó un ovario de mayor tamaño pero sin óvulos, mientras que el restante 17 %, que equivale a dos ovarios, presentaron 3 y 5 primordios de óvulo en forma de pequeñas nucelas aplanadas (Fig. 11A, C, D).

Flores femeninas

En las flores femeninas tratadas con las diferentes concentraciones de ANA (**5 μM** , n= 18; **25 μM** n= 18), se observó que algunos óvulos aumentaron de tamaño en comparación con los óvulos de ovarios no inyectados (n= 18) y tratados solamente con **DMSO** (n= 18). El promedio de óvulos en flores no inyectadas fue de 174.1 ± 8.54 , tratadas con sólo DMSO 172.8 ± 8.68 , mientras que las inyectadas con distintas concentraciones de auxina: 5 μM , 195.7 ± 14.85 y 25 μM 212.7 ± 7.63 (Fig. 12B-F).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 11.42$; $P= 0.0097$, Fig. 12A). Con la prueba de comparación múltiple de Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -20.53), DMSO vs. 25 μM ANA (diferencia de suma de rangos= -19.81).

FLORES MASCULINAS TIPO 1 + ANA (tres aplicaciones)

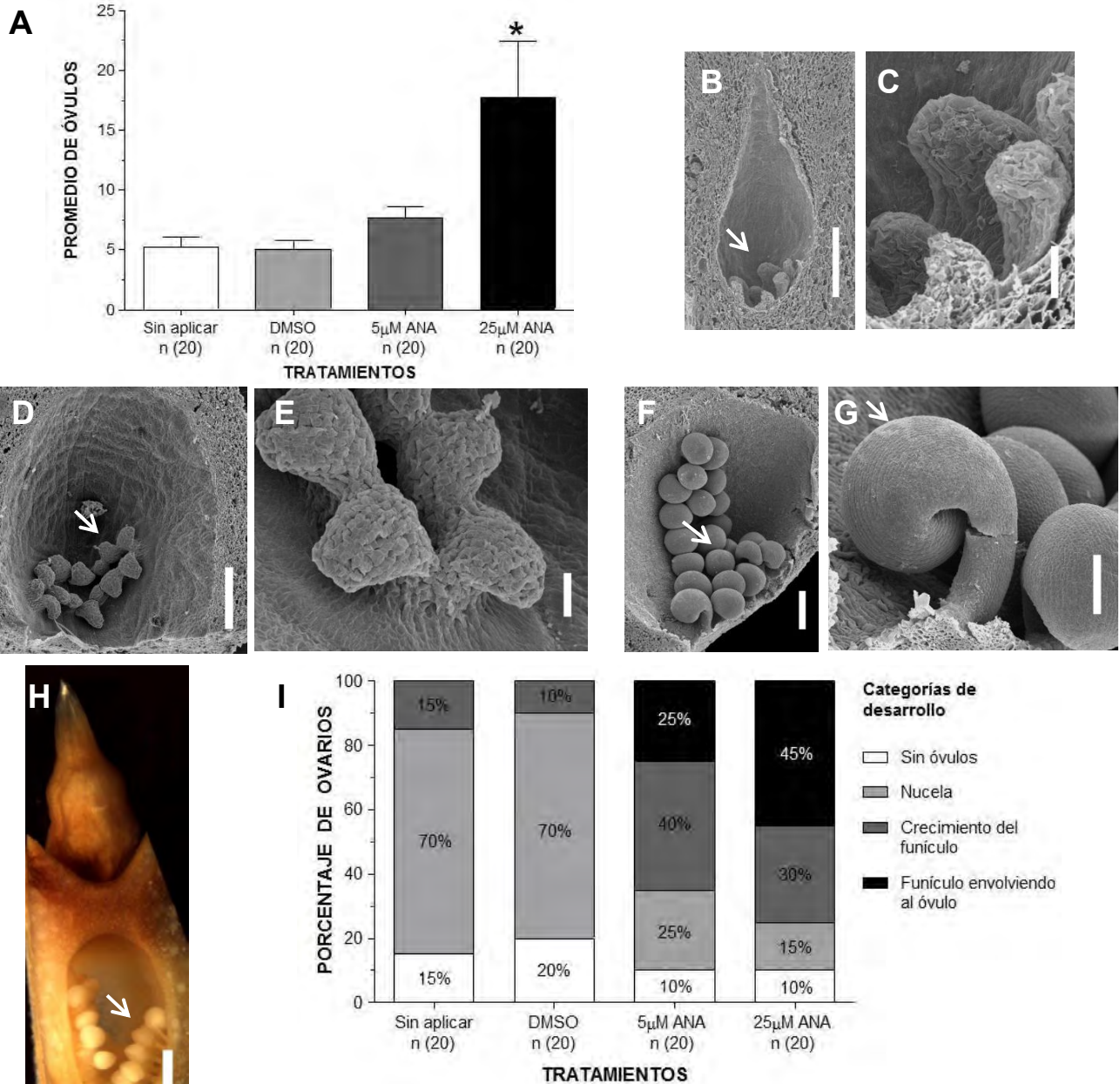


Figura 9. Flores masculinas del tipo 1 tratadas en tres ocasiones con diferentes concentraciones de ANA. **A)** Promedio de óvulos por ovario de flores control y tratadas con distintas concentraciones de ANA. El * indica diferencia significativa con respecto a los controles ($K-W= 13.72$; $P= 0.0033$). **B)** Ovario tratado con sólo DMSO, la flecha indica primordios ovulares. **C)** Primordios de óvulos tratados con DMSO. **D)** Ovario tratado con 5 µM ANA. La flecha muestra óvulos creciendo de la pared del ovario. **E)** Óvulos tratados con 5 µM ANA. **F, H)** Ovarios tratados con 25 µM ANA. Las flechas muestran óvulos en crecimiento. **G)** Óvulos tratados con 25 µM ANA. El funículo (flecha) envuelve casi al óvulo. **I)** Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo distintos tratamientos de ANA. **J)** Óvulo maduro de flor femenina sin tratamiento. Escalas: 200 µm (**B, D, J**), 30 µm (**C, E**), 2 mm (**H**), 300 µm (**F**), 100 µm (**G**).

FLORES MASCULINAS TIPO 2 + ANA (tres aplicaciones)

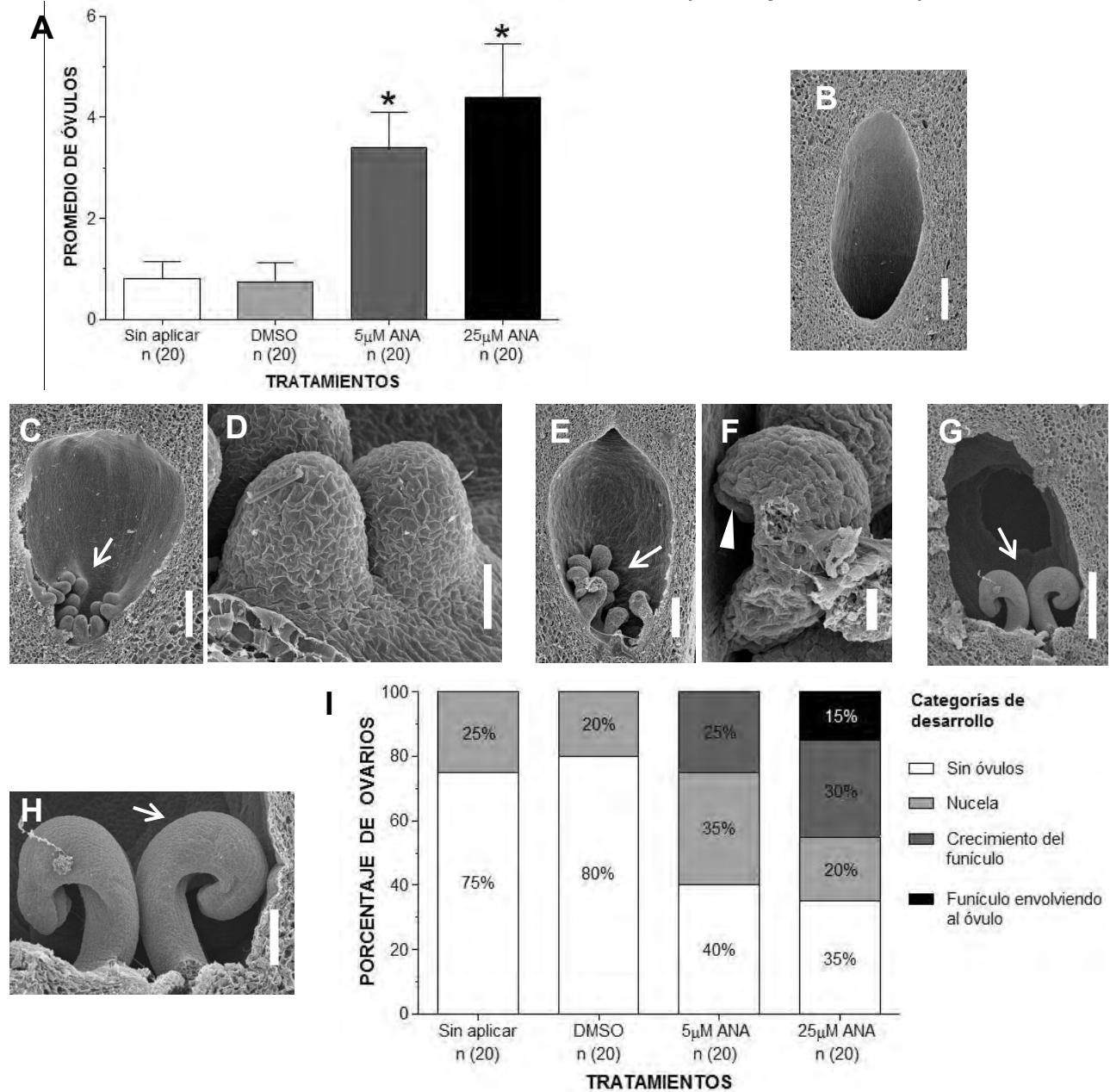


Figura 10. Flores masculinas del tipo 2 tratadas en tres ocasiones con diferentes concentraciones de ANA. **A**) Promedio de óvulos por ovario de flores control y tratadas con distintas concentraciones de ANA. El * indica diferencia significativa con respecto a los controles ($K-W= 17.52$; $P= 0.0006$). **B**) Ovario control sin tratar, la cavidad del ovario está vacía. **C**) Ovario tratado con 5 μM ANA. La flecha muestra óvulos creciendo de la pared del ovario. **D**) Óvulos tratados con 5 μM ANA. **E**, **G**) Ovarios tratados con 25 μM ANA. Las flechas muestran óvulos en desarrollo. **F**, **H**) Óvulos tratados con 25 μM ANA. **F**) La cabeza de flecha muestra el inicio del tegumento interno. **H**) Funiculo (flecha) en crecimiento y curvándose. **I**) Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo con distintos tratamientos de ANA. Escalas: 300 μm (**B**, **G**), 200 μm (**C**, **E**), 30 μm (**D**, **F**), 100 μm (**H**).

FLORES MASCULINAS TIPO 3 + ANA (tres aplicaciones)

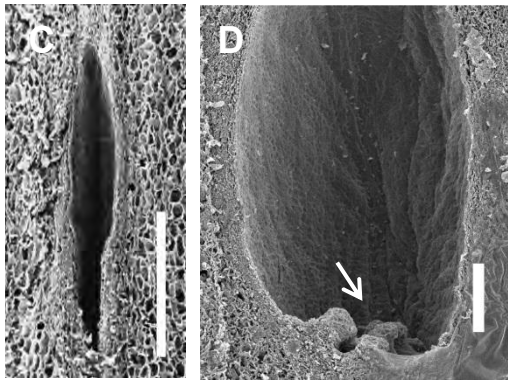
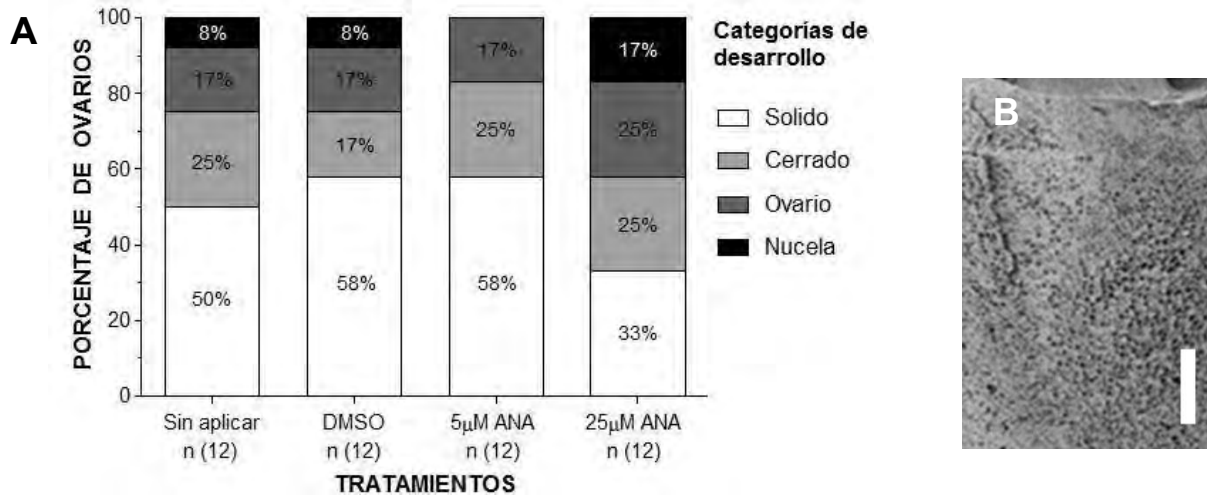


Figura 11. Flores masculinas del tipo 3 tratadas en tres ocasiones con diferentes concentraciones de ANA. **A)** Porcentaje acumulado de ovarios observados y óvulos en diferentes etapas de desarrollo con diferentes tratamientos de ANA. **B)** Ovario de tratamiento control sin aplicar, no hay cavidad de ovario. **C, D)** Flores tratadas con 25 µM ANA. En **(C)** se desarrolló la cavidad del ovario, mientras que en **(D)** además se desarrollaron primordios de óvulos (flecha). Escalas: 500 µm **(B)**, 400 µm **(C)**, 100 µm **(D)**.

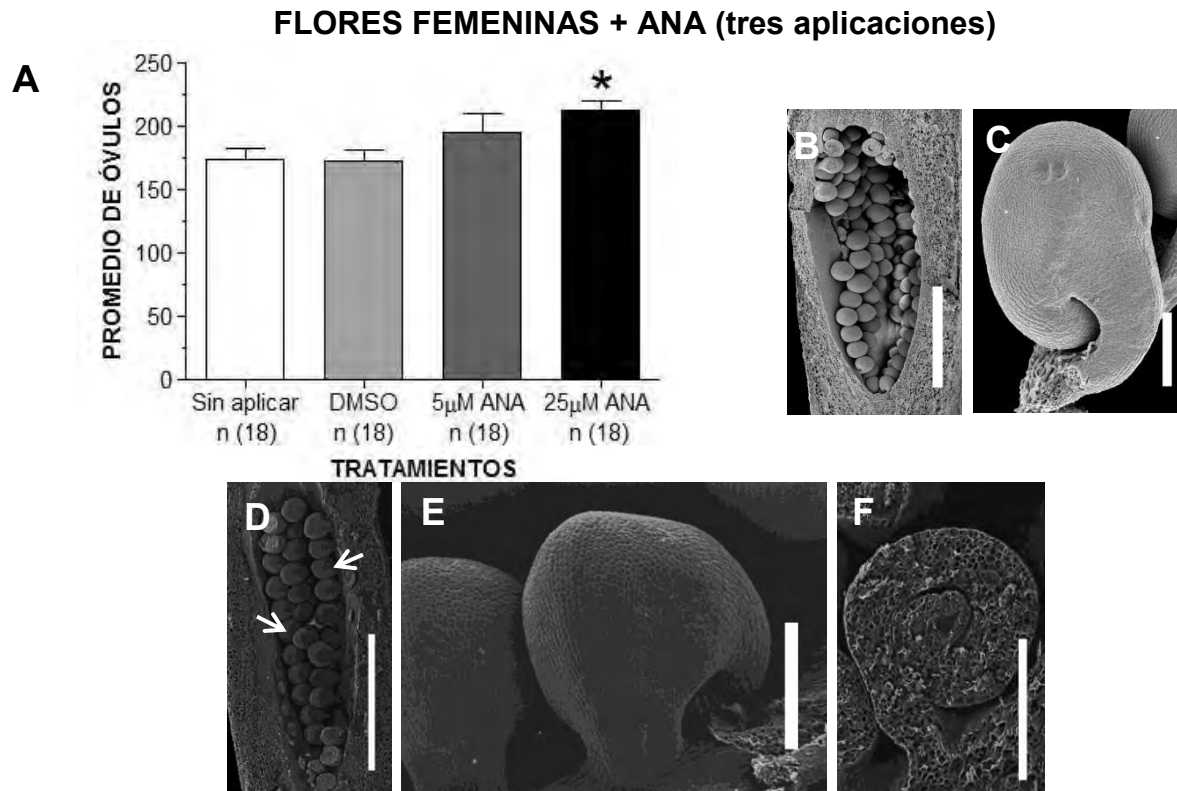


Figura 12. Flores femeninas tratadas en tres ocasiones con diferentes concentraciones de ANA. **A)** Promedio de óvulos por ovario de flores control y tratadas con distintas concentraciones de ANA. El * indica diferencia significativa con respecto a los controles ($K-W= 11.42$; $P= 0.0097$). **B)** Ovario de control sin tratar. **C)** Óvulo sin tratamiento. **D)** Ovario tratado con $25 \mu\text{M}$ ANA. Las flechas muestran óvulos. **E, F)** Óvulos tratados con $25 \mu\text{M}$ ANA, **F** es un corte longitudinal de óvulo. Escalas: 2 mm (**B, D**), 200 μm (**C, E, F**).

Tres aplicaciones del inhibidor del transporte de auxinas (Naptalam, NPA) a nivel del ovario

En estos experimentos, el inhibidor de auxinas NPA disuelto en agua destilada se inyectó directamente en el ovario de botones florales masculinos y femeninos en **tres ocasiones** con una diferencia de 48 h entre cada inyección. Los controles consistieron en 1) no aplicar ninguna inyección y 2) en inyectar solamente agua destilada en tres ocasiones.

Flores masculinas del tipo 1

Las flores que exhiben por lo general sólo óvulos inmaduros en la base del ovario fueron inyectadas únicamente con **agua destilada** ($n= 20$), pero no hubo cambios ni en el desarrollo ni en el promedio de óvulos (5.1 ± 0.83), en comparación con las que no fueron inyectadas ($n= 20$), con un promedio de 5.25 ± 0.79 (Fig. 13B, C, F). En los ovarios a los que se les

aplicó **10 μ M de NPA** (n= 20), se observó una reducción en el promedio de óvulos (2.2 ± 0.52) en comparación a los controles (sin inyectar y agua destilada). Con esta misma concentración de NPA, se observó un aumento en el porcentaje de ovarios que no desarrollan óvulos, siendo el 50 % del total de los ovarios analizados; un 40 % presentó primordios de óvulos, los cuales son nucelas aplanadas y el 10 % de los ovarios presentó óvulos con crecimiento del funículo (Fig. 13D-F).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($K-W= 9.88$ $P= 0.0071$, Fig. 13A). Con la prueba de comparación múltiple de Dunn, se obtuvo que las diferencias están entre: sin aplicar vs. 10 μ M NPA (diferencia de suma de rangos= 15.5) y H₂O vs. 10 μ M NPA (diferencia de suma de rangos= 13.98).

Flores masculinas del tipo 2

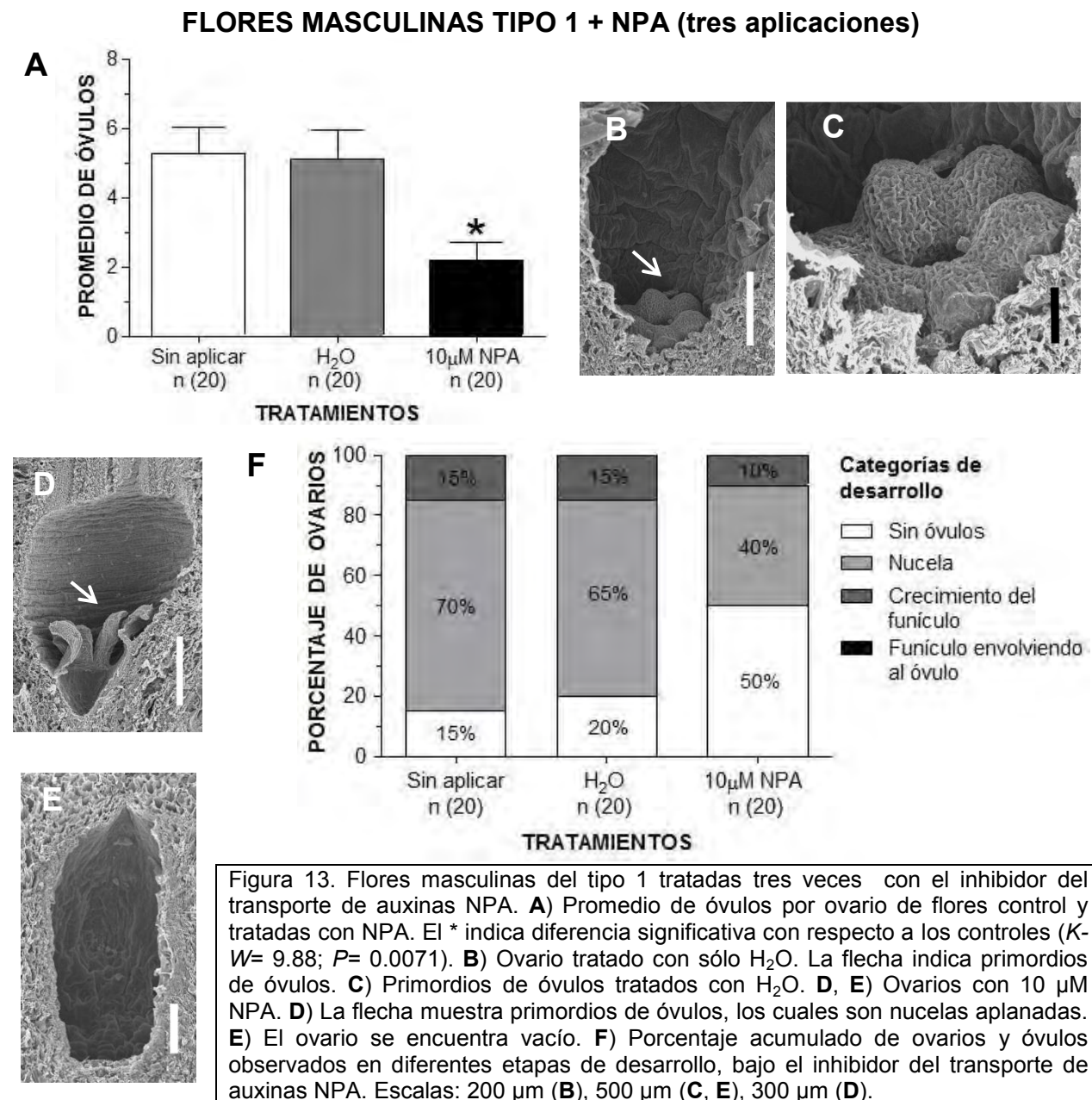
Las flores que generalmente desarrollan un ovario carente de óvulos y que fueron inyectadas sólo con **agua destilada** (n= 20), no presentaron ningún cambio en el desarrollo del ovario ni en el promedio de óvulos formados (0.7 ± 0.32), en relación con las que no se les inyectó ninguna sustancia (n= 20), con un promedio de 0.8 ± 0.34 (Fig.14A, B). En los ovarios aplicados con **10 μ M de NPA** (n= 20) se observó una ligera reducción en el promedio de número de óvulos (0.3 ± 0.2) sin llegar a ser estadísticamente significativa, en comparación a los controles (sin inyectar y agua destilada). Un 90 % de los ovarios examinados no desarrollaron óvulos y el 10 % restante presentaron primordios de óvulos, los cuales son nucelas aplanadas y alargadas (Fig. 14A, C).

Flores masculinas del tipo 3

Este tipo de flores generalmente carece de ovario y cuando se les aplicó solamente **agua destilada** (n= 12), no presentaron cambios en el desarrollo del ovario respecto a las que no fueron inyectadas (n= 12). No obstante, los ovarios tratados con **10 μ M de NPA** (n= 12), mostraron un porcentaje mayor (66 %) de flores que no presentan un ovario, un 17 % mostró una ligera abertura y el último 17 % un ovario sin óvulos (Figs. 15). En ninguno de los ovarios examinados se detectó el desarrollo de nucelas.

Flores femeninas

En las flores femeninas tratadas con **10 μM de NPA** ($n= 18$), se observó una reducción estadísticamente no significativa en el promedio del número de óvulos (154.4 ± 8.57) en comparación con los controles: sin aplicar ($n= 18$; 174.1 ± 8.54) y aplicando sólo H_2O ($n= 18$; 174.2 ± 7.89). En ocasiones se observó una ligera reducción en el tamaño de los óvulos (Fig. 16).



FLORES MASCULINAS TIPO 2 + NPA (tres aplicaciones)

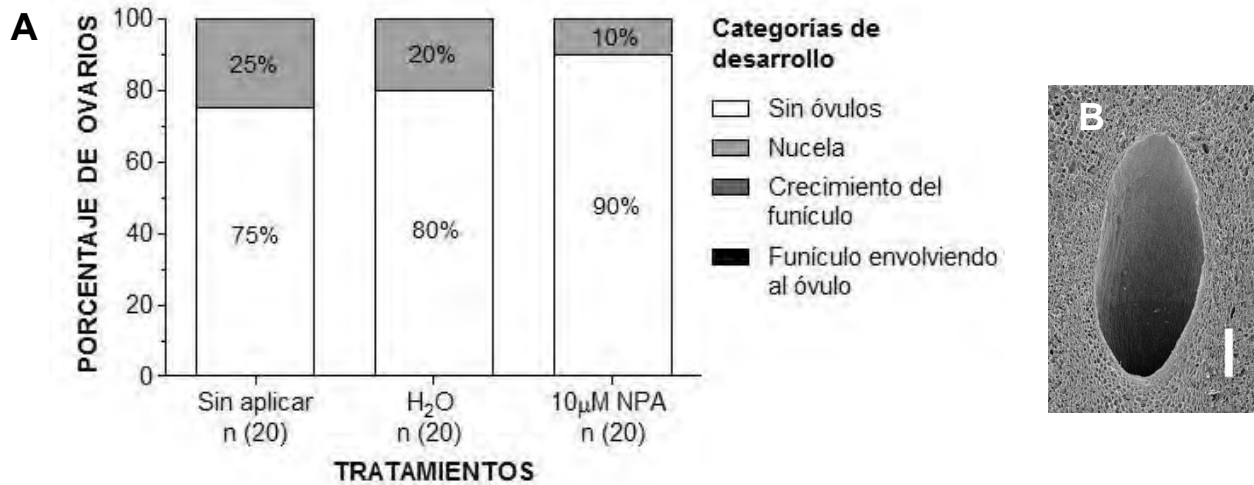


Figura 14. Flores masculinas del tipo 2 tratadas tres veces con el inhibidor del transporte de auxinas NPA. **A)** Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo el inhibidor del transporte de auxinas NPA. **B)** Ovario sin tratar, cavidad del ovario sin óvulos. **C)** Ovario tratado con 10 μM NPA. Escalas: 300 μm (**B**), 1 mm (**C**).

FLORES MASCULINAS TIPO 3 + NPA (tres aplicaciones)

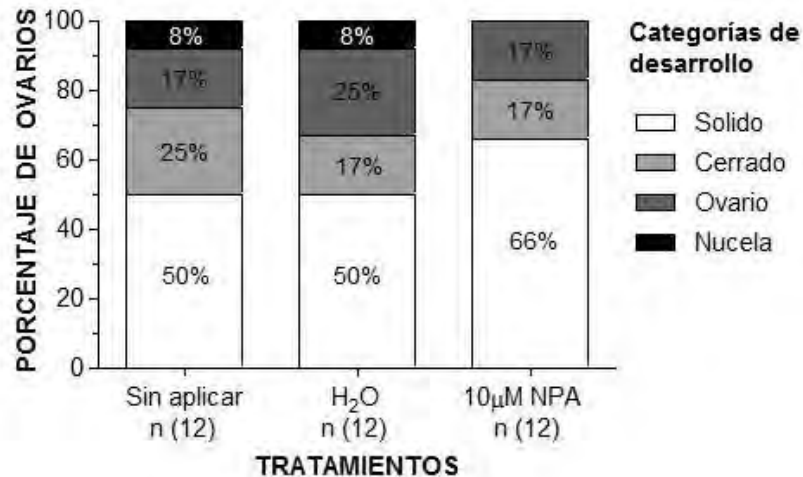


Figura 15. Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, de flores masculinas del tipo 3, tratadas tres veces con el inhibidor del transporte de auxinas NPA. La mayoría de las flores de todos los tratamientos no presentaron cavidad del ovario.

FLORES FEMENINAS + NPA (tres aplicaciones)

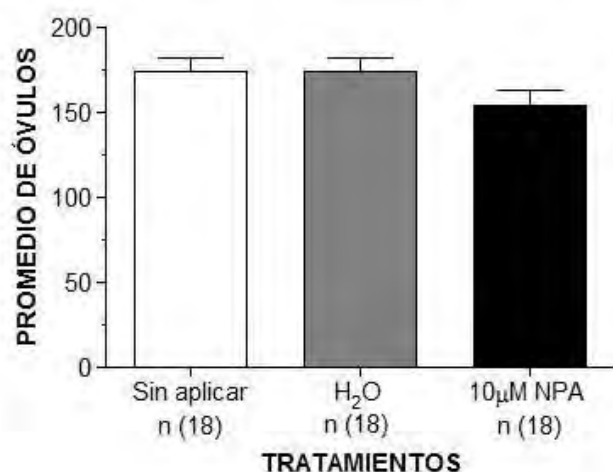


Figura 16. Promedio de óvulos por ovario de flores femeninas, tratadas tres veces con el inhibidor del transporte de auxinas NPA ($K-W= 2.70$; $P= 0.25$), no hay diferencias significativas.

Análisis a nivel del ovario de las flores masculinas que se trataron exógenamente con auxina (ANA) disuelta en lanolina, en la parte apical del estilo

En estos experimentos, se llevó a cabo la microaplicación exógena de auxina (ANA) 25 µM mezclada con lanolina con 2.5 % de parafina, en la parte apical de estilos de botones florales masculinos. El tratamiento control consistió en aplicar únicamente DMSO con la lanolina sobre los estilos.

Flores masculinas del tipo 1

En las flores que presentan generalmente sólo óvulos inmaduros en la base del ovario, con la aplicación de sólo **DMSO** ($n= 25$), no presentaron cambios en el desarrollo ni en el promedio del número de óvulos (5.12 ± 0.76 ; Fig. 17B, C, H). En los estilos tratados con **25 µM de ANA** ($n= 25$), hubo cambios en el ovario, se incrementó el número de óvulos, con un promedio de 8.92 ± 1.22 . Los óvulos adicionales se desarrollaron a partir de las paredes laterales del ovario (Fig. 17D, E). Un 28 % de los ovarios observados presentaron óvulos con mayor crecimiento del funículo y un 44 % desarrolló un funículo que envuelve casi a la totalidad del óvulo con una morfología externa semejante a la observada en los óvulos maduros de flores femeninas (Fig. 17D-H).

Con la *t-tests* se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (*t-tests*, $t=2.628$, $df=48$; $P=0.0057$; Fig. 17A).

Flores masculinas del tipo 2

Las flores que por lo general no desarrollan óvulos, tratadas únicamente con **DMSO** ($n=25$), no presentaron cambios en el desarrollo del ovario ni en el promedio de número de óvulos por ovario (0.52 ± 0.23 ; Fig. 18B, G). Las flores aplicadas con **25 μM de ANA** ($n=25$) en la parte apical del estilo, mostraron un incremento en el número de primordios ovulares y algunos óvulos con mayor desarrollo (3.92 ± 0.73). El 40 % de los ovarios tratados con **25 μM de ANA** que fueron analizados no formaron óvulos; un 28 % tuvo un crecimiento mayor del funículo y un 12 % desarrolló un funículo muy largo que casi envuelve al resto del óvulo (Figs. 18C-G).

Con la *t-tests* se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (*t-tests*, $t=4.389$, $df=48$; $P=0.0001$; Fig. 18A).

Flores masculinas del tipo 3

En las flores masculinas que generalmente carecen de cavidad del ovario, después de la aplicación de **DMSO** ($n=25$), no presentaron ningún cambio respecto a flores sin tratamiento alguno. Con la aplicación de **25 μM de ANA** ($n=25$) en el ápice de los estilos, un 40 % de las flores no mostraron cavidad del ovario, el 24 % sólo presentó una sutil abertura, otro 24 % un ovario sin óvulos, mientras que el restante 12 % que equivale a tres ovarios presentaron 3, 4 y 5 primordios de óvulo, los cuales forman nucelas aplanadas (Fig. 19A-C).

FLORES MASCULINAS TIPO 1 + ANA-LANOLINA (una aplicación)

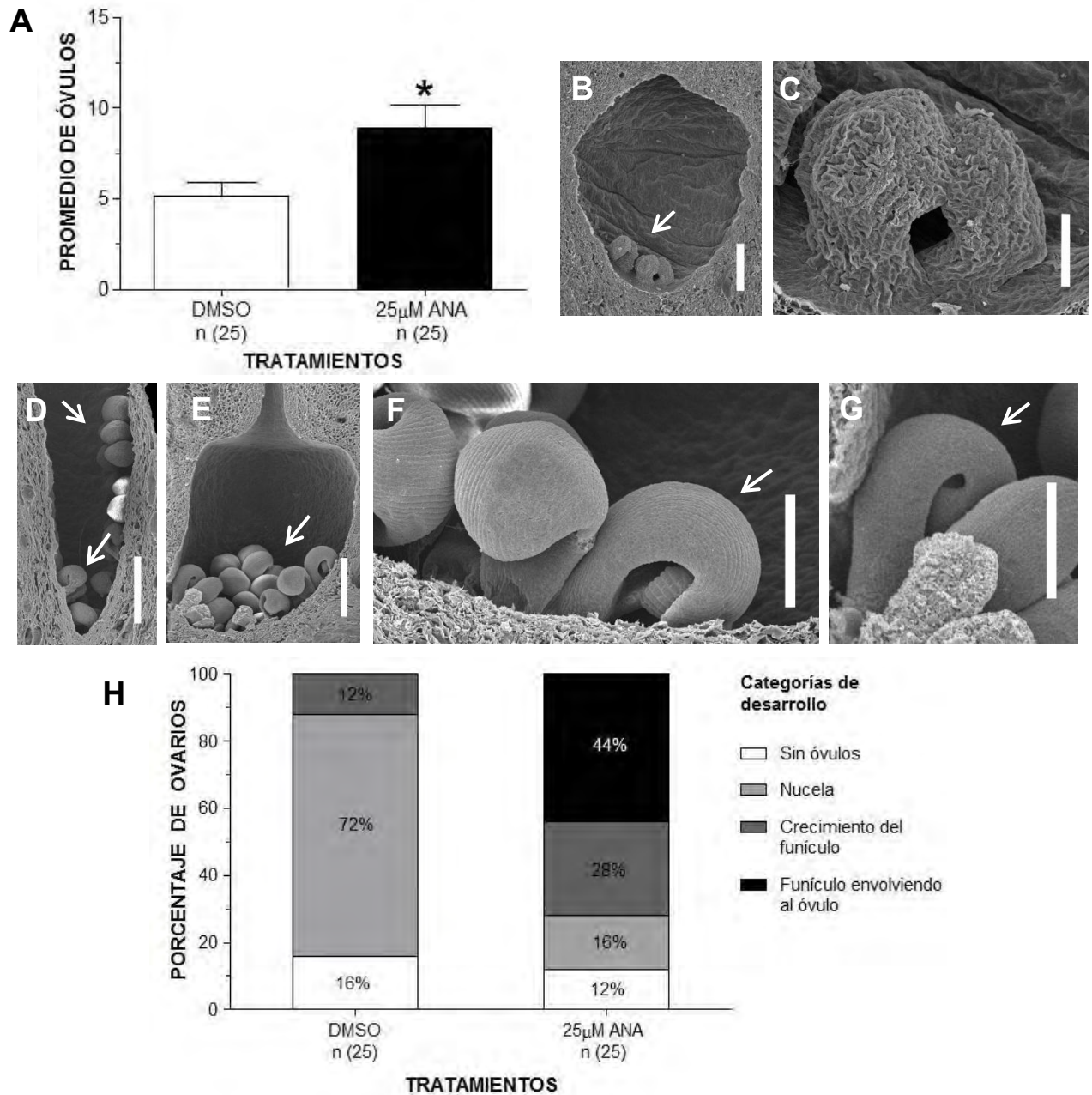


Figura 17. Flores masculinas del tipo 1 tratadas con 25 µM ANA. **A**) Promedio de óvulos por ovario de flores tratadas bajo 25 µM ANA. El * indica diferencia significativa con respecto al control (*t*-tests, $t = 2.628$, $df = 48$; $P = 0.0057$). **B**) Control con DMSO. **C**) Primordios de óvulos tratados con DMSO. **D**, **E**) Ovarios tratados con 25 µM ANA. Las flechas muestran óvulos en crecimiento. **F**, **G**) Óvulos tratados con 25 µM ANA. El funículo (flechas) envuelve casi al óvulo. **H**) Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo el tratamiento de 25 µM ANA. Escalas: 200 µm (**B**, **F**, **G**), 50 µm (**C**), 500 µm (**D**, **E**).

FLORES MASCULINAS TIPO 2 + ANA-LANOLINA (una aplicación)

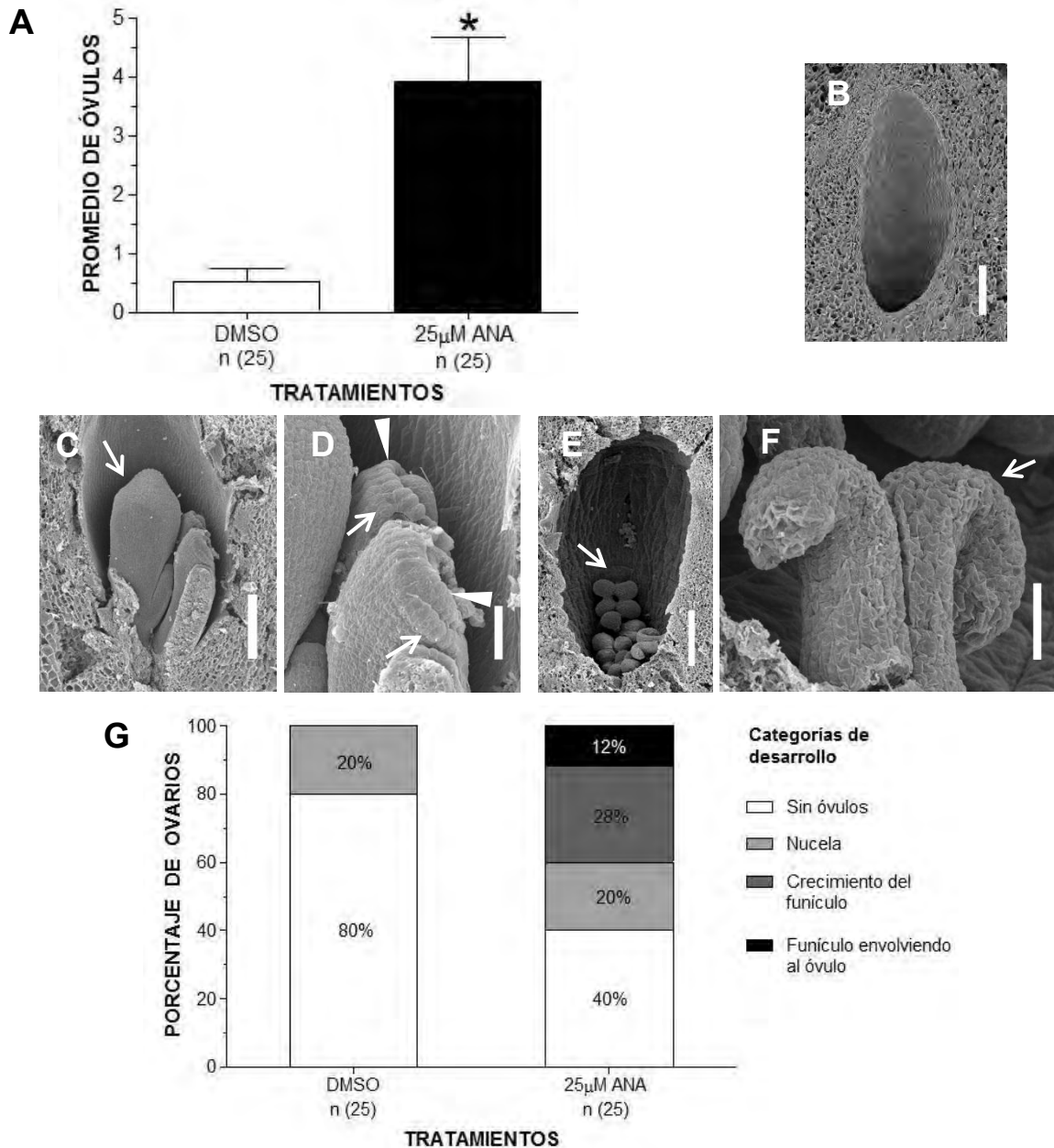


Figura 18. Flores masculinas del tipo 2 tratadas con 25 μM ANA. **A**) Promedio de óvulos por ovario de flores tratadas, bajo 25 μM ANA. El * indica diferencia significativa con respecto al control (*t*-tests, $t = 4.389$, $df = 48$; $P = 0.0001$). **B**) Control con DMSO, cavidad del ovario sin óvulos. **C**, **E**) Ovarios tratados con 25 μM ANA. La flecha muestra óvulos. **D**, **F**) Óvulos tratados con 25 μM ANA. **D**) Las cabezas de flecha muestra el inicio del tegumento interno, las flechas el inicio del tegumento externo. **F**) El funículo (flecha) envuelve casi al óvulo. **G**) Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo el tratamiento de 25 μM ANA. Escalas: 200 μm (**B**, **C**), 50 μm (**D**, **F**), 300 μm (**E**).

FLORES MASCULINAS TIPO 3 + ANA-LANOLINA (una aplicación)

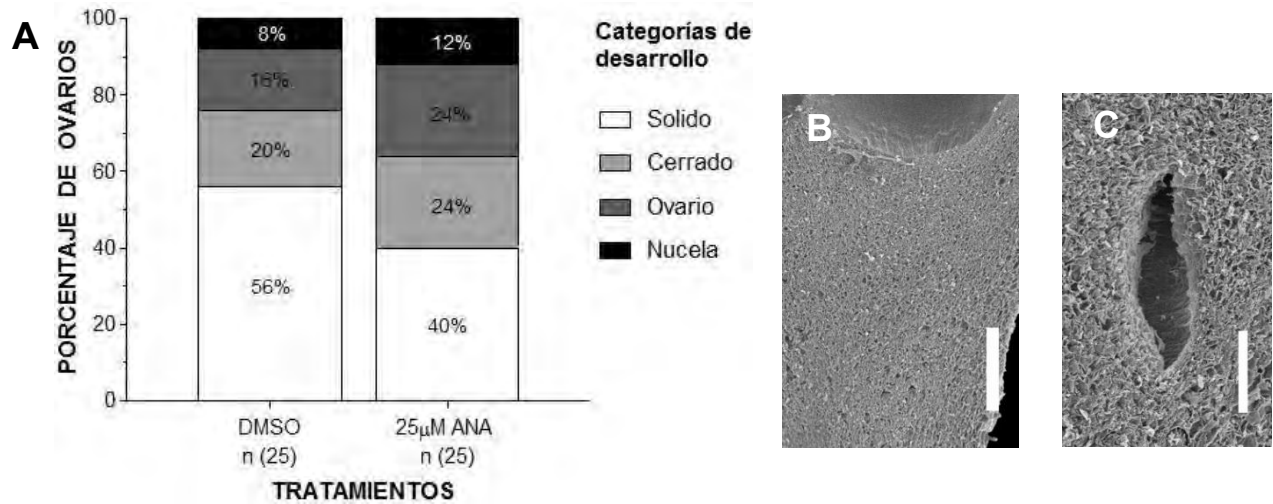


Figura 19. Flores masculinas del tipo 3 tratadas con 25 µM ANA. **A)** Porcentaje acumulado de ovarios y óvulos observados en diferentes etapas de desarrollo, bajo el tratamiento de 25 µM ANA. **B)** Control sin tratar, no se desarrolló la cavidad del ovario. **C)** Flor tratada con 25 µM ANA. Se desarrolló la cavidad del ovario. Escalas: 300 µm (**B**), 100 µm (**C**).

Desarrollo de óvulos de flores masculinas del tipo 1 que fueron tratadas exógenamente con auxina (ANA)

Los óvulos de flores masculinas del tipo 1, tratadas con DMSO (tratamiento control) y 25 µM de ANA (con una, tres inyecciones o disuelta en lanolina); se incluyeron en la resina LR-White.

Los ovarios que no fueron tratados y los tratados únicamente con DMSO, presentan nucelas cuyo máximo punto de desarrollo es la formación de primordios del tegumento interno y externo, así como la formación de la célula madre de la megaspora (Fig. 20A). En flores tratadas con 25 µM ANA, el máximo desarrollo obtenido, es la formación del saco embrionario tipo Polygonum (ovocélula, dos sinérgidas, tres antípodas y célula central binucleada), el crecimiento y curvatura del funículo semejante a la flor femenina (Fig. 20B-E). Se observó en algunos óvulos de flores masculinas tratadas con 25 µM ANA, que en su morfología externa se asemejaron a óvulos maduros de flores femeninas, no desarrollaron saco embrionario, sólo se encontró tejido nucelar (Figs. 20F, H).

FLORES MASCULINAS TIPO 1 + ANA

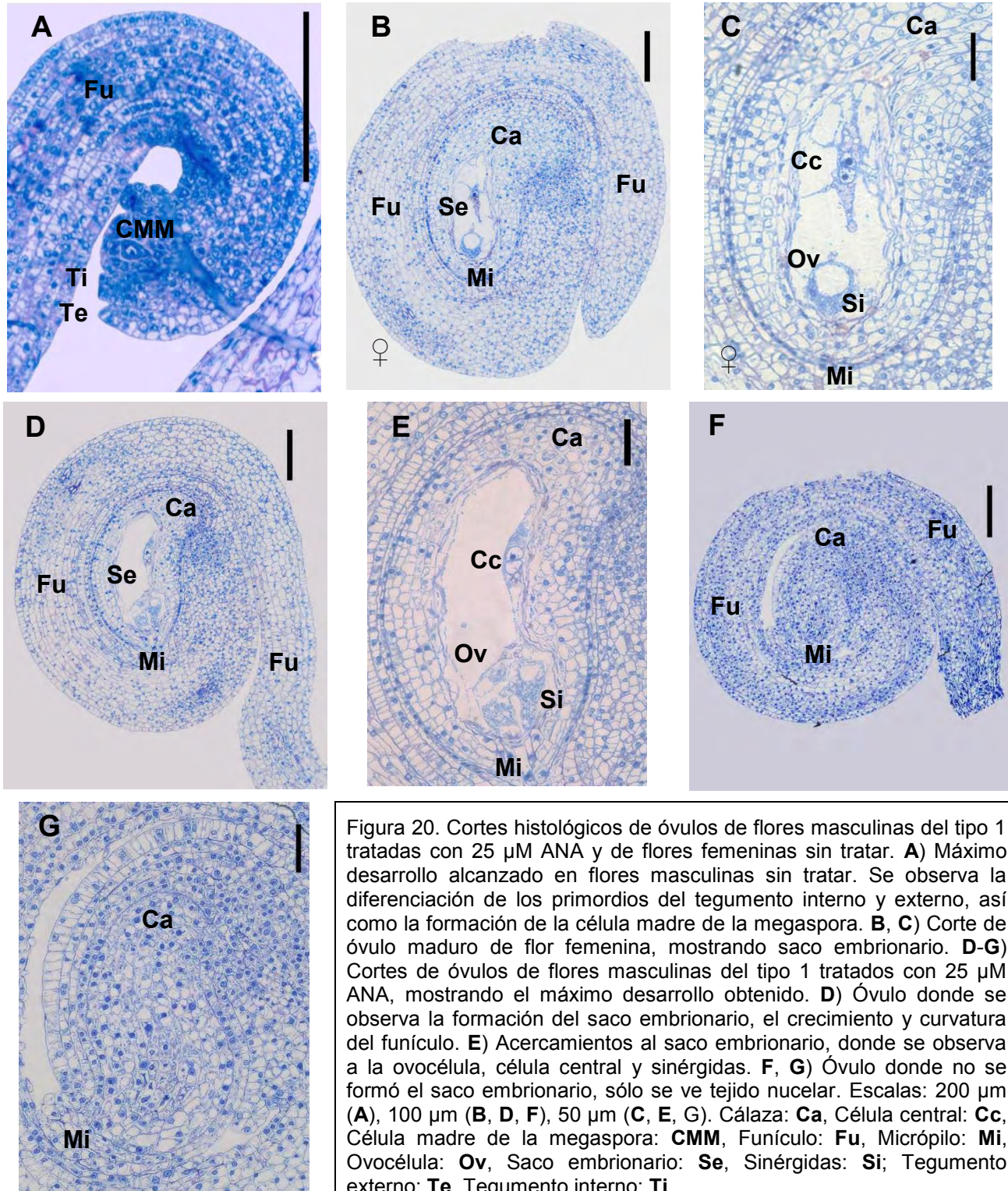


Figura 20. Cortes histológicos de óvulos de flores masculinas del tipo 1 tratadas con 25 μ M ANA y de flores femeninas sin tratar. **A)** Máximo desarrollo alcanzado en flores masculinas sin tratar. Se observa la diferenciación de los primordios del tegumento interno y externo, así como la formación de la célula madre de la megaspora. **B, C)** Corte de óvulo maduro de flor femenina, mostrando saco embrionario. **D-G)** Cortes de óvulos de flores masculinas del tipo 1 tratados con 25 μ M ANA, mostrando el máximo desarrollo obtenido. **D)** Óvulo donde se observa la formación del saco embrionario, el crecimiento y curvatura del funículo. **E)** Acercamientos al saco embrionario, donde se observa a la ovocélula, célula central y sinérgidas. **F, G)** Óvulo donde no se formó el saco embrionario, sólo se ve tejido nucelar. Escalas: 200 μ m (**A**), 100 μ m (**B, D, F**), 50 μ m (**C, E, G**). Cálaza: **Ca**, Célula central: **Cc**, Célula madre de la megaspora: **CMM**, Funículo: **Fu**, Micrópilo: **Mi**, Ovocélula: **Ov**, Saco embrionario: **Se**, Sinérgidas: **Si**; Tegumento externo: **Te**, Tegumento interno: **Ti**.

Aplicación exógena de auxina (ANA) disuelta en lanolina, en la parte apical del estilo de flores masculinas

Para inducir la diferenciación de tejido estigmático en las flores masculinas y evaluar si estos estigmas formados permiten la germinación de los granos de polen y si el tubo polínico crece a través del estilo, se llevó a cabo la microaplicación exógena de auxina (ANA) a una concentración de 25 μ M disuelta en lanolina, en la parte apical de estilos de botones florales masculinos de las dos primeras etapas del desarrollo. Los tratamientos control consistieron en 1) aplicar únicamente DMSO con la lanolina sobre los estilos en desarrollo y 2) la no aplicación de lanolina.

Flores femeninas sin ningún tratamiento

Las flores femeninas presentan un estilo y un estigma (de 8 a 10 lóbulos estigmáticos con numerosas papilas) bien desarrollados (Fig. 21A). Se analizó la histología de la parte basal, media y apical de los estilos. En el corte basal cercano a la inserción con el ovario, se observó una gran cantidad de células de mucílago, haces vasculares bien definidos y hacia el centro el tejido de transmisión rodeando al canal estilar, que en este nivel se encuentra casi cerrado. En la región media del estilo, hay menor cantidad de células del mucílago, mayor número de haces vasculares y el tejido de transmisión rodea al canal estilar que alcanza su mayor amplitud a este nivel (Fig. 21B). En la parte apical del estilo, éste se bifurca para dar origen a los lóbulos estigmáticos. Cada lóbulo presenta un haz vascular y se encuentra cubierto por numerosas papilas estigmáticas (Fig. 21C).

Flores masculinas.

Las flores masculinas de los tres tipos que fueron sujetas a los tratamientos control (únicamente **DMSO** con lanolina y la no aplicación de lanolina), presentaron un estilo corto con dos o cuatro lóbulos muy reducidos sin papilas estigmáticas, de tal manera que el estilo termina en punta (Fig. 22A). Al analizar la histología de la parte basal, media y apical del estilo, se encontró que en la región basal hay una gran cantidad de células mucilaginosas, los haces vasculares son pequeños, el tejido de transmisión se encuentra reducido y el canal estilar cerrado. En la región media del estilo, el canal estilar está casi cerrado, el tejido de transmisión está reducido, los haces vasculares son pequeños y las células de mucílago son

menos abundantes que en la región basal (Fig. 22B). En la parte apical del estilo, los carpelos no están totalmente fusionados y no hay diferenciación de tejido estigmático, los haces vasculares son más grandes (Fig. 22C).

Los estilos tratados con **25 μM de ANA**, presentaron varios cambios morfológicos con respecto a los controles. Estos cambios consistieron en la formación de estructuras similares a lóbulos estigmáticos. En algunos casos en estos lóbulos no hubo desarrollo de células papilosas (Fig. 22D), pero en otros se observó un alargamiento en las células epidérmicas en el ápice del carpelo, sin que llegaran a formar papilas (Fig. 22E). En escasos pistilos tratados hubo una mayor diferenciación, ésta consistió en el desarrollo de tejido estigmático (Fig. 22F), aunque éste se presentó en cantidad reducida en comparación al presentado en los estigmas de las flores femeninas (Fig. 22G). A nivel histológico los estilos tratados con 25 μM de ANA presentaron un incremento en la formación y diferenciación de los haces vasculares, el diámetro del canal estilar fue mayor y el tejido de transmisión aumentó (Fig. 22H-J).

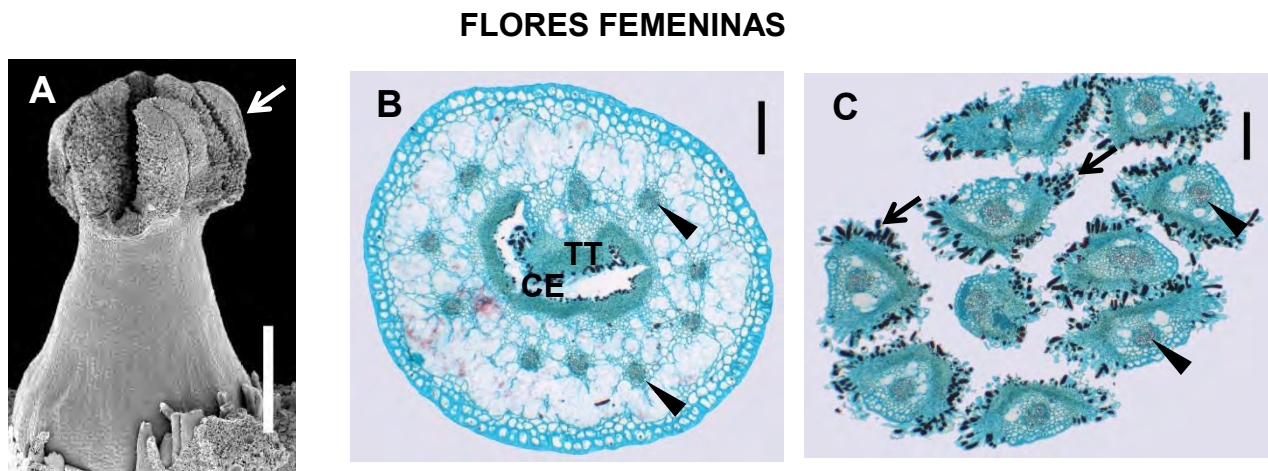


Figura 21. Estilo de flor femenina. **A)** Estilo sin tratar. La flecha indica los lóbulos estigmáticos. **B, C)** Cortes transversales de estilos no tratados. **B)** Corte de la región media del estilo. Haces vasculares bien desarrollados (cabezas de flecha), canal estilar amplio y tejido de transmisión fácilmente visible. **C)** Corte apical del estilo, con varios lóbulos estigmáticos cubiertos de papilas estigmáticas (flechas), las cabezas de flecha indican los haces vasculares. Escalas: 1 mm (**A**), 400 μm (**B, C**). Canal estilar: **CE**, Tejido de transmisión: **TT**.

FLORES MASCULINAS TRATADAS CON ANA DISUELTO EN LANOLINA

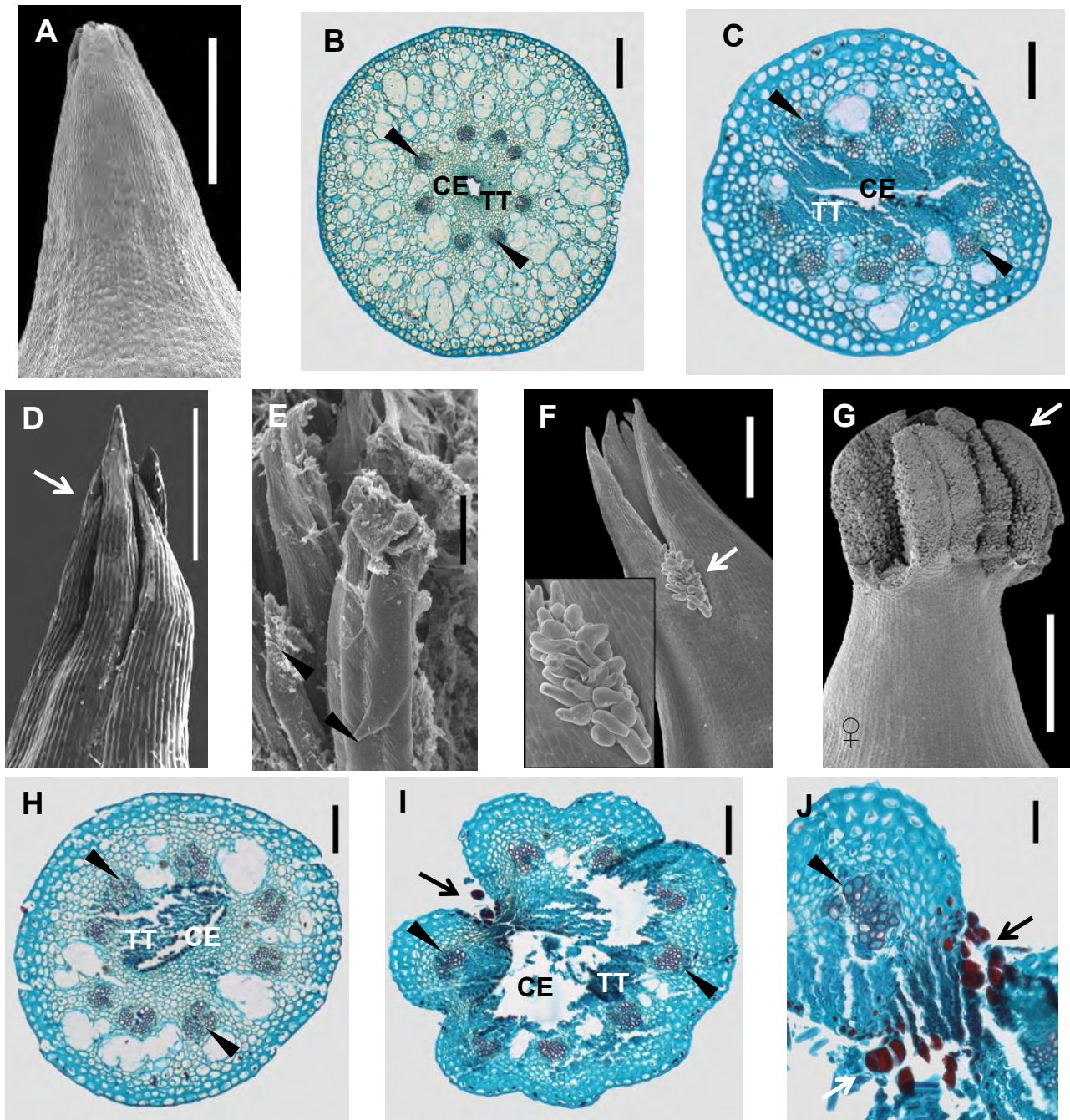


Figura 22. Flores masculinas tratadas con 25 μM ANA. **A-C)** Estilos control (sólo DMSO). Parte apical del estilo sin ramificaciones (**A**). Cortes transversales de la región media (**B**) y apical (**C**) del estilo. **D-F)** Estilos tratados con 25 μM de ANA. **D)** Se observan ramificaciones (flecha) del ápice del estilo. **E)** La cabeza de flecha señala la elongación de células de la epidermis de la parte apical del estilo. **F)** La flecha muestra la formación de tejido estigmático. En el recuadro se muestra un acercamiento de esta área. **G)** Estigma de una flor femenina sin tratar (flecha). **H-J)** Cortes transversales de estilos de flores masculinas tratadas con 25 μM ANA. **H)** Zona media del estilo. **I, J)** Zona apical del estilo. Las flechas indican la diferenciación de papilas estigmáticas, mientras, las cabezas de flecha hacen vasculares. Escalas: 1 mm (**A, G**), 400 μm (**B, D**), 200 μm (**C, H, I**), 20 μm (**E**), 500 μm (**F**), 100 μm (**J**). Canal estilar: **CE**, Tejido de transmisión: **TT**.

Funcionalidad de los pistilos de flores masculinas tratadas exógenamente con auxina (ANA) disuelta en lanolina

Con el objetivo de conocer si los estigmas formados por la aplicación exógena de auxina (ANA) en flores masculinas son funcionales, se analizó si los granos de polen germinaron y si los tubos polínicos crecieron a través del estilo después de la polinización. Después de siete días de la microaplicación exógena de auxina (ANA) a una concentración de 25 μ M disuelta en lanolina y del control con sólo DMSO-lanolina, se realizaron polinizaciones manualmente con granos de polen de flores masculinas no tratadas provenientes de diferentes individuos (polinización cruzada). Como control adicional se polinizaron estigmas de flores femeninas en etapas de antesis.

En las flores masculinas control (DMSO-lanolina), por lo general los granos de polen presentaron dificultades para adherirse al estilo, por esta razón no se detectó crecimiento de los tubos polínicos (Fig. 23A). Las flores masculinas que presentaron alargamiento de las células epidérmicas de la parte apical del estilo, sin llegar a formar papilas, tras el tratamiento con 25 μ M ANA, mejoraron la adherencia de los granos de polen, los cuales se hidrataron (Fig. 23B) pero no llegaron a germinar (Fig. 23C). No obstante, en los estilos que tras el tratamiento con 25 μ M de ANA desarrollaron tejido estigmático, se detectó una mayor cantidad de granos de polen que se adhirieron, se hidrataron e incluso algunos de ellos fueron capaces de germinar (Fig. 23D-G). Sin embargo, no se observaron tubos polínicos creciendo a través del tejido de transmisión (Fig. 23H).

En las flores femeninas se observaron granos de polen germinando, así como tubos polínicos creciendo a través del tejido de transmisión hasta la base del estilo, como era de esperarse (Fig. 23I, J).

Las tablas 3, 4, 5 y 6 resumen los resultados de los diferentes experimentos realizados tanto en flores femeninas como masculinas.

**FLORES MASCULINAS POLINIZADAS DESPUÉS DE SER TRATADAS CON ANA
DISUELTA EN LANOLINA**

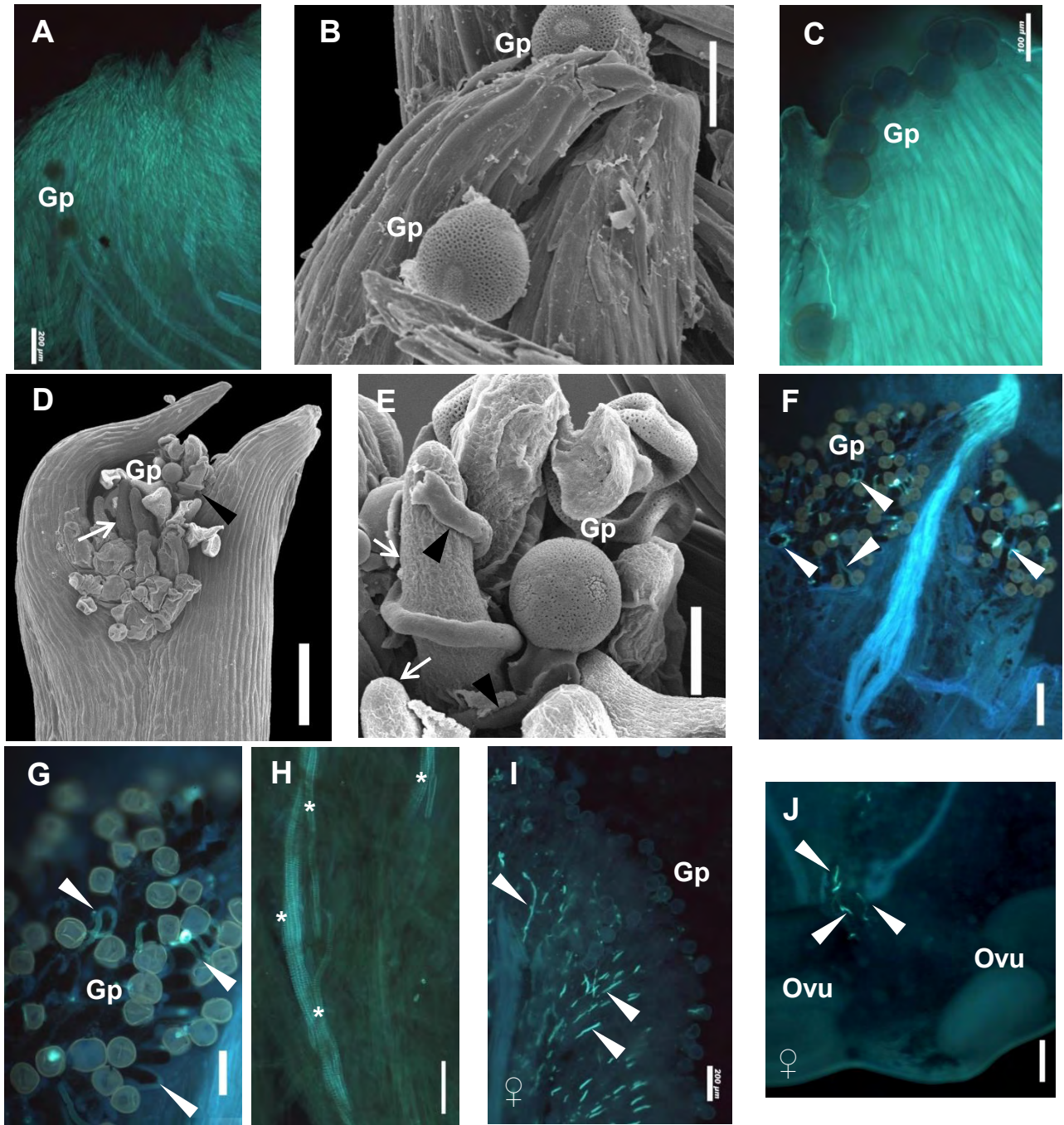


Figura 23. Flores masculinas polinizadas después del tratamiento con 25 μ M de ANA. **A-H)** Estilos de flores masculinas. **A)** Estilo tratado con sólo DMSO, no hubo crecimiento de tubos polínicos. **B-H)** Estilos tratados con 25 μ M ANA. **B, C)** En los estilos sólo con alargamiento de las células epidérmicas, sin llegar a formar papilas, permitieron únicamente la hidratación del grano de polen. **D-H)** Los estilos que formaron tejido estigmático, permitieron la germinación del grano de polen. Las flechas indican papilas estigmáticas, mientras las cabezas de flecha señalan los tubos polínicos. Sin embargo, **(H)** no se observaron tubos polínicos creciendo a través del estilo, los * señalan xilema. **I, J)** Flores femeninas polinizadas. Estigma con una gran cantidad de granos de polen germinando **(I)**. Parte donde se inserta el estilo al ovario **(J)**. Las cabezas de flecha indican tubos polínicos. Escalas: 200 μ m **(A, D, F, I, J)**, 40 μ m **(B, E)**, 100 μ m **(C, G, H)**. Grano de polen: **Gp**, Óvulo: **Ovu**.

Tabla 3. Flores femeninas tratadas con las diferentes concentraciones de auxina (ANA) y con el inhibidor del transporte de auxinas Naptalam (NPA).

Con una sola inyección				
Tratamiento	# de flores analizadas	Promedio de óvulos	Desarrollo del óvulo	Desarrollo del estilo
Sin aplicar	20	172.9 ± 9.74	Óvulo maduro	Completo
Sólo DMSO	20	171.1 ± 5.79	Sin variación	Sin cambios evidentes
5µM ANA	20	183.9 ± 6.64	Algunos aumentan de tamaño	Sin cambios evidentes
25µM ANA	20	201.1 ± 7.69 ^a	Algunos aumentan de tamaño	Sin cambios evidentes
Sólo H ₂ O	20	173.2 ± 7.66	Sin variación	Sin cambios evidentes
10µM NPA	20	160.9 ± 7.93	Algunos disminuyen de tamaño	Sin cambios evidentes
Con tres inyecciones				
Sin aplicar	18	174.1 ± 8.54	Óvulo maduro	Completo
Sólo DMSO	18	172.8 ± 8.68	Sin variación	Sin cambios evidentes
5µM ANA	18	195.7 ± 14.85	Algunos aumentan de tamaño	Sin cambios evidentes
25µM ANA	18	212.7 ± 7.63 ^c	Algunos aumentan de tamaño	Sin cambios evidentes
Sólo H ₂ O	18	174.2 ± 7.89	Sin variación	Sin cambios evidentes
10µM NPA	18	154.4 ± 8.57	Algunos disminuyen de tamaño	Sin cambios evidentes

El ^a indica diferencia significativa con respecto al control sin aplicar. El ^c indica diferencia significativa con respecto a los controles (sin aplicar y sólo DMSO).

Tabla 4. Flores masculinas del tipo 1 tratadas con diferentes concentraciones de ANA y con el inhibidor del transporte de auxinas Naptalam (NPA).

Son las flor masculinas que generalmente presentan sólo óvulos inmaduros en la base del ovario										
Con una sola inyección										
Tratamiento	# de flores analizadas	Promedio de óvulos	% de óvulos en distintas etapas				Máximo desarrollo del estilo			
			SÓ	Nu	CF	FEÓ	TP	LRA	LSP	DTE
Sin aplicar	30	3.96 ± 0.41	10	77	13	-	X			
Sólo DMSO	30	3.76 ± 0.48	16	77	7	-	X			
5µM ANA	30	8.83 ± 1.28 ^c	10	46	33	10		X		
25µM ANA	30	7.46 ± 0.86 ^c	10	27	23	40*			X	
Sólo H ₂ O	30	3.56 ± 0.52	17	70	13	-	X			
10µM NPA	30	2.33 ± 0.48 ^a	47	43	10	-	X			
Con tres inyecciones										
Sin aplicar	20	5.25 ± 0.79	15	70	15	-	X			
Sólo DMSO	20	5 ± 0.79	20	70	10	-	X			
5µM ANA	20	7.65 ± 0.93	10	25	40	25		X		
25µM ANA	20	17.75 ± 4.67 ^c	10	15	30	45*			X	
Sólo H ₂ O	20	5.1 ± 0.83	20	65	15	-	X			
10µM NPA	20	2.2 ± 0.52 ^d	50	40	10	-	X			
Disuelta en lanolina										
Sólo DMSO	25	5.12 ± 0.76	16	72	12	-	X			
25µM ANA	25	8.92 ± 1.22 ^b	12	16	28	44*				X**

El ^a indica diferencia significativa con respecto al control sin aplicar. El ^b indica diferencia significativa con respecto al control DMSO. El ^c indica diferencia significativa con respecto a los controles (sin aplicar y sólo DMSO). El ^d indica diferencia significativa con respecto a los controles (sin aplicar y sólo H₂O). **CF**: Crecimiento del funículo, **DTE**: Desarrollo de tejido estigmático, **FEÓ**: Funículo envolviendo al óvulo, **LRA**: Leve ramificación del ápice (más de cuatro lóbulos reducidos), **LSP**: Lóbulos estigmáticos sin papilas, **Nu**: Nucela, **SÓ**: Sin óvulos, **TP**: Termina en punta. *Algunos óvulos desarrollaron saco embrionario y en otros se observó sólo tejido nucelar. **Germinaron granos de polen sobre este tejido estigmático desarrollado.

Tabla 5. Flores masculinas del tipo 2 tratadas con diferentes concentraciones de ANA y con el inhibidor del transporte de auxinas Naptalam (NPA).

Son las flores masculinas que generalmente no presentan óvulos										
Con una sola inyección										
Tratamiento	# de flores analizadas	Promedio de óvulos	% de óvulos en distintas etapas				Máximo desarrollo del estilo			
			SÓ	Nu	CF	FEÓ	TP	LRA	LSP	DTE
Sin aplicar	30	0.36 ± 0.18	87	13	-	-	X			
Sólo DMSO	30	0.33 ± 0.19	90	10	-	-	X			
5µM ANA	30	3.43 ± 0.95 ^c	53	30	17	-		X		
25µM ANA	30	2.03 ± 0.41 ^c	50	13	27	10			X	
Sólo H ₂ O	30	0.3 ± 0.15	87	13	-	-	X			
10µM NPA	30	0.2 ± 0.14	93	7	-	-	X			
Con tres inyecciones										
Sin aplicar	20	0.8 ± 0.34	75	25	-	-	X			
Sólo DMSO	20	0.75 ± 0.36	80	20	-	-	X			
5µM ANA	20	3.4 ± 0.69 ^c	40	35	25	-		X		
25µM ANA	20	4.4 ± 1.05 ^c	35	20	30	15			X	
Sólo H ₂ O	20	0.7 ± 0.32	80	20	-	-	X			
10µM NPA	20	0.3 ± 0.2	90	10	-	-	X			
Disuelta en lanolina										
Sólo DMSO	25	0.52 ± 0.23	80	20	-	-	X			
25µM ANA	25	3.92 ± 0.73 ^b	40	20	28	12				X**

El ^b indica diferencia significativa con respecto al control DMSO. El ^c indica diferencia significativa con respecto a los controles (sin aplicar y sólo DMSO). **CF**: Crecimiento del funículo, **DTE**: Desarrollo de tejido estigmático, **FEÓ**: Funículo envolviendo al óvulo, **LRA**: Leve ramificación del ápice (más de cuatro lóbulos reducidos), **LSP**: Lóbulos estigmáticos sin papilas, **Nu**: Nucela, **SÓ**: Sin óvulos, **TP**: Termina en punta. **Germinaron granos de polen sobre este tejido estigmático desarrollado.

Tabla 6. Flores masculinas del tipo 3 tratadas con diferentes concentraciones de ANA y con el inhibidor del transporte de auxinas Naptalam (NPA).

Son las flores masculinas que generalmente no presentan ovario										
Con tres inyecciones										
Tratamiento	# de flores analizadas	Promedio de óvulos	% de ovarios en distintas etapas				Máximo desarrollo del estilo			
			Sol	Ce	Ova	Nu	TP	LRA	LSP	DTE
Sin aplicar	12	0.25 ± 0.25	50	25	17	8	X			
Sólo DMSO	12	0.16 ± 0.16	58	17	17	8	X			
5µM ANA	12	0	58	25	17	-		X		
25µM ANA	12	0.66 ± 0.46	33	25	25	17			X	
Sólo H ₂ O	12	0.16 ± 0.16	50	17	25	8	X			
10µM NPA	12	0	66	17	17	-	X			
Disuelta en lanolina										
Sólo DMSO	25	0.2 ± 0.14	56	20	16	8	X			
25µM	25	0.48 ± 0.27	40	24	24	12				X**

Ce: Cerrado, **DTE**: Desarrollo de tejido estigmático, **LRA**: Leve ramificación del ápice (más de cuatro lóbulos reducidos), **LSP**: Lóbulos estigmáticos sin papilas, **Nu**: Nucela, **Ova**: Ovario, **Sol**: Solido, **TP**: Termina en punta. **Germinaron granos de polen sobre este tejido estigmático desarrollado.

DISCUSIÓN

Opuntia stenopetala es una de las 27 especies de las aproximadamente 2000 de la familia Cactaceae que poseen un sistema sexual diferente al hermafrodita, en particular tiene un sistema dioico por presentar individuos tanto masculinos como femeninos (Orozco-Arrollo *et al.*, 2012).

Comparación de pistilos de especies con flores masculinas en Cactaceae

Las flores masculinas de *O. stenopetala* a nivel del ovario presentan tres fenotipos: cavidad del ovario reducido sin o con óvulos inmaduros y sin cavidad del ovario. Dentro de las especies de *Pereskia* que poseen flores masculinas, la ausencia de óvulos ocurre en *P. portulacifolia* (Camacho, 2009) y ocasionalmente en *P. zinniiflora* (Leuenberger, 1986), mientras *P. quisqueyana* y *P. marcanoi* poseen óvulos anormales (Leuenberger, 1986; Areces-Mallea, 1992). En la subfamilia Opuntioideae, la ausencia de óvulos ocurre algunas veces en la flor masculina de *Opuntia robusta*, aunque hay flores que presentan óvulos que no llegan a la madurez (Silva, 2007; Hernández, 2008). En las siete especies dioicas del género *Consolea*, las flores masculinas presentan óvulos que en etapa de antesis se encuentran totalmente degenerados (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000; Strittmatter *et al.*, 2002, 2006, 2008; Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004). En la subfamilia Cactoideae, las flores masculinas de *Pachycereus pringlei* usualmente carecen de óvulos, en su lugar hay masas de tejido funicular, algunos individuos presentan óvulos anormales (Fleming *et al.*, 1994; Núñez, 2004). En *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus*, se producen óvulos aparentemente maduros, aunque no se detectó la formación de frutos ni en campo ni *ex situ* por polinizaciones manuales (Hernández, 2011).

Las flores masculinas de las cactáceas pueden o no presentar estigma. En el caso de *O. stenopetala*, el estilo se considera un estilodio porque no es funcional y porque carece de estigma donde los granos de polen pueden germinar. Las cuatro especies del género *Pereskia* que poseen flores masculinas, presentan lóbulos estigmáticos que carecen de papilas (Leuenberger, 1986; Areces-Mallea, 1992; Camacho, 2009). Por otro lado los estigmas de las flores masculinas de *O. robusta* (Silva, 2007; Hernández, 2008), *Consolea*

spinosissima y *C. rubescens* (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000; Strittmatter *et al.*, 2002), son reducidos y sus lóbulos estigmáticos permanecen cerrados en la antesis. En la subfamilia Cactoideae, la zona estigmática de las flores masculinas de *E. coccineus* (Hoffman, 1992; Hernández, 2011), *E. polyacanthus* (Hernández, 2011) y *E. yavapaiensis* (Baker, 2006) se encuentra reducida, de igual forma sus lóbulos estigmáticos permanecen parcialmente cerrados. Para *P. pringlei*, lo único que se menciona es que el estigma de las flores masculinas se desarrolla completamente (Fleming *et al.*, 1994).

Se encontró que a nivel histológico los estilos de las flores masculinas de *O. stenopetala*, presentan un tejido de transmisión reducido, un menor número de haces vasculares (poco diferenciados) y un canal estilar casi cerrado en comparación con las flores femeninas que poseen un tejido de transmisión de mayor tamaño, mayor número de haces vasculares (bien diferenciados) y un canal estilar más amplio formado por células papiladas de la epidermis interna de los carpelos que se fusionan. Lo cual corrobora los trabajos de Orozco (2002, 2005, 2012) y Orozco-Arroyo *et al.* (2012).

En las flores masculinas de *P. portulacifolia*, el tejido de transmisión abarca de tres a ocho estratos de células subepidérmicas, el canal estilar alcanza su diámetro mayor en la zona donde se inserta el estigmodio. Además, el canal estilar (epidermis interna de los carpelos) no está formado por células papiladas (Camacho, 2009). En *O. robusta* de la subfamilia Opuntioideae, la flor masculina presenta un tejido de transmisión reducido, la epidermis interna de los carpelos que forma el canal estilar tiene células papiladas; en ocasiones el estilo posee el mismo número de haces vasculares que el de la flor femenina (Silva, 2007; Hernández, 2008). En el trabajo realizado por Strittmatter *et al.* (2002), sobre la especie subdioica *C. spinosissima* que presenta tres morfos sexuales: hermafrodita, femenino y masculino, describe para los tres morfos en corte transversal de los estilos una epidermis externa, córtex (formado de parénquima), cinco haces vasculares, tejido de transmisión y un canal estilar rodeado de un estrato epidérmico glandular. En la subfamilia Cactoideae, las flores masculinas de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* presentan un tejido de transmisión reducido y un canal estilar con células papiladas (Hernández, 2011).

Los estilos de flores masculinas de *O. robusta*, *C. spinosissima*, *E. coccineus* y *E. polyacanthus* resultan estructuralmente más parecidos a los estilos de flores femeninas que a los estilodios de flores masculinas de *O. stenopetala*, lo cual puede representar una etapa evolutiva diferente y gradual durante la pérdida del estigma-estilo en flores unisexuales masculinas de Cactaceae.

Hormonas y procesos involucrados en la diferenciación sexual

En las especies de angiospermas donde se presentan flores masculinas con un gineceo reducido, la esterilidad femenina se ha relacionado con defectos morfológicos o la ausencia de algunas estructuras como el estigma, estilo, ovario u óvulos, como ocurre en *Vitis vinifera* ssp. *Silvestris* (Caporali *et al.*, 2003), *Asparagus officinalis* (Lazarte y Palser, 1979; Caporali *et al.*, 1994), *Actinidia deliciosa* (Coimbra *et al.*, 2004), *P. portulacifolia* (Camacho, 2009), *O. robusta* (Silva, 2007), *C. spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002), *E. coccineus* y *E. polyacanthus* (Hernández, 2011).

El origen de ciertos defectos en el desarrollo del gineceo de flores masculinas se han esclarecido en algunas especies monoicas con flores unisexuales como en *Zea mays* (Cheng *et al.*, 1983; Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993). La flor masculina del maíz inicia su desarrollo como hermafrodita, posteriormente las células del primordio carpelar sufren vacuolización y eliminación de organelos (Cheng *et al.*, 1983), dando como resultado la interrupción del crecimiento del gineceo. En el estudio realizado por Calderon-Urrea y Dellaporta (1999) demostraron que el gineceo de las flores masculinas del maíz sufren muerte celular programada (MCP), estando involucrada la fragmentación del ADN. Otros cambios que muestran las células son: la condensación de la cromatina y la contracción celular (Noodén, 2004).

El proceso de masculinización en el maíz está en parte bajo el control de los genes *tasselseed1* (*ts1*) y *tasselseed* (*ts2*), las mutaciones en estos genes muestran un fenotipo sencillo, la transformación de flores masculinas a femeninas (Irish *et al.* 1994; DeLong *et al.*, 1993). El gen *ts1* codifica una lipoxigenasa que al parecer está implicada en la ruta de la biosíntesis del ácido jasmónico (Acosta *et al.*, 2009); mientras que *ts2* codifica para una

deshidrogenasa hidroxisteroide, posiblemente involucrada en la ruta de la biosíntesis de los brasinoesteroides (BRs; Wu *et al.*, 2007). Los BRs presentan interacciones regulatorias complejas con las giberelinas, el ácido jasmónico y el ácido abscísico (Wu *et al.*, 2007), estas interacciones están implicadas en la MCP (Hoeberichts y Wilting 2003; Lam, 2004). La MCP es un proceso estrictamente controlado e implicado en diferentes programas de diferenciación y desarrollo del ciclo de vida de las plantas (Lam, 2004), incluido el proceso de desarrollo de flores unisexuales como en *A. deliciosa* (Coimbra *et al.*, 2004), *O. robusta* (Alfaro, 2008; Hernández, 2008), *E. coccineus*, *E. polyacanthus* (Hernández, 2011) y propuesto (pero no demostrado) para seis especies del género *Consolea* (Strittmatter *et al.*, 2006). También se relacionan a los BRs en la activación de la degeneración de primordios del gineceo en flores masculinas del maíz (Hartwig *et al.*, 2011).

En el caso de *O. stenopetala* se ha propuesto que ocurre MCP atemporal o errónea en anteras de flores femeninas, lo que puede originar esterilidad masculina (Flores, 2005; Alfaro, 2008; Flores-Rentería *et al.*, 2013). Sin embargo, utilizando la prueba de TUNEL en los pistilos de flores masculinas Orozco (2012) menciona que no hay señales de MCP durante el desarrollo de los estilos, lo mismo ocurre para los estilos funcionales de las flores femeninas de *O. stenopetala*. No obstante, en las flores masculinas de *O. robusta*, *E. coccineus* y *E. polyacanthus* se ha detectado MCP mediante la prueba de TUNEL, en algunas células del tejido de transmisión y células del córtex del estilo en etapas cercanas a la antesis (Hernández, 2008, 2011), lo que sucede habitualmente en el tejido de transmisión poco antes y durante la polinización en las flores femeninas o hermafroditas, ya que se requiere que estas células degeneren y liberen material celular para ayudar al proceso de germinación del grano de polen en la superficie estigmática y al crecimiento del tubo polínico a través del estilo (Wu y Cheung, 2000). A nivel del ovario en *O. robusta* y *E. polyacanthus*, células de la placenta y óvulos (específicamente en el funículo y la nucela) presentan MCP, lo que conduce a la esterilidad femenina en estas especies (Hernández, 2008, 2011).

Por lo anterior, se puede sugerir que en el gineceo de flores masculinas de *O. stenopetala* pudieran estar ocurriendo procesos de MCP en tejidos muy específicos como en células de la placenta o en los óvulos inmaduros, sin embargo, no se ha realizado la prueba

de TUNEL. En caso de ocurrir MCP, este evento pudiera estar relacionado con brasinoesteroides, giberelinas, ácido jasmónico, ácido abscísico, auxinas, (Hoeberichts y Wltering 2003; Lam, 2004; Wu *et al.*, 2007; Hartwig *et al.*, 2011; Orozco, 2012).

Otra especie que presenta flores unisexuales es el pepino (*Cucumis sativus*), que posee un sistema sexual monoico, es decir, que en el mismo individuo se presentan tanto flores femeninas como masculinas. Sin embargo, algunos linajes producen flores hermafroditas, por lo que dependiendo del porcentaje de producción de flores hermafroditas, femeninas y masculinas, es posible encontrar sistemas monoicos, andromonoicos, hermafroditas y dioicos. En los individuos monoicos, se ha observado que tratamientos con etileno causa un efecto feminizante, mientras que inhibidores de la biosíntesis de etileno o la percepción de etileno reducen la producción de flores pistiladas, esto también ocurre en *Cucumis melo* (Perl-Treves 1999; Ando *et al.*, 2001; Papadopoulou *et al.*, 2005).

En estudios realizados en *C. sativus*, el etileno sobre-regula los genes CS-ACS (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa), que participan en la vía biosintética del etileno (por lo que el etileno auto-catalíticamente se regula; Oeller *et al.* 1991) en plantas monoicas y femeninas, pero no en las especies andromonoicas (Kamachi *et al.*, 1997). El RNAm de CS-ACS2 se empieza a acumular justo debajo del primordio del pistilo en botones en etapa bisexual de poblaciones monoicas y dioicas del pepino. En las flores que van a desarrollarse como femeninas, el RNAm de CS-ACS2 se acumula en la región central del ovario en desarrollo, donde se forma la placenta y los óvulos. Esto indica que la biosíntesis de etileno mediada por la ruta de CS-ACS2 en botones florales está asociado con la diferenciación y el desarrollo de las flores femeninas (Saito *et al.*, 2007). Sin embargo, en otra especie de Curcubitaceae, la sandía (*Citrullus spp.*), el efecto feminizante de etileno no ocurre, en contraste el etileno tiene un efecto masculinizante (Salman-Minkov *et al.*, 2008).

La importancia de las auxinas en el desarrollo del gineceo y su papel en la unisexualidad de *Opuntia stenopetala*

Siendo las auxinas fitoreguladores que están implicados en procesos de regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Ellis *et al.*, 2005; Nagpal *et al.*, 2005; Cecchetti *et al.*,

2008; Taiz y Zeiger, 2010), la distribución desigual y los cambios locales en los niveles de auxinas, operan como señales moduladoras de la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Orozco, 2012). En esta investigación se llevó a cabo la microaplicación exógena de la auxina ácido 1-naftaleno acético (ANA) en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala* obteniendo un incremento en el número de óvulos y en ocasiones un mayor desarrollo en éstos en comparación con los de los gineceos reducidos no tratados y con aquellos tratados con el inhibidor del transporte de auxinas (Naptalam, NPA). Estos últimos tuvieron un menor número de óvulos y algunos de éstos presentaron un tamaño y diferenciación menor. Lo anterior implica que puede recuperarse cierto grado de feminización al aplicar auxinas exógenamente en etapas tempranas del desarrollo de flores estériles femeninas de *O. stenopetala*, incluso en aquellas que no presentan ovario. Se ha observado en otras especies que la aplicación exógena o la alteración en la síntesis de auxinas y de otras hormonas tienen efectos de feminización o masculinización (Golenberg y West, 2013 y citas ahí; Anexo 2).

El mejor de los tratamientos sobre los estilos resultó ser aquel donde se aplica la auxina (ANA) disuelta en lanolina y que fue el que Orozco-Arroyo *et al.* (2012) aplicaron inicialmente, ya que algunas células de la parte apical del estilo se diferenciaron en papilas estigmáticas, el canal estilar fue más amplio, se desarrolló más tejido de transmisión y el número de haces vasculares aumentó. Incluso estos estilos tratados permitieron evaluar la funcionalidad del tejido estigmático formado por la aplicación exógena de ANA. Al polinizar estos estigmas manualmente los granos de polen se adhirieron, se hidrataron y algunos lograron germinar, aunque no se observaron tubos polínicos creciendo a través del tejido de transmisión. Esto último puede deberse a que falta todavía un mayor desarrollo o diferenciación de las células que conforman el tejido de transmisión. En el estudio de polinizaciones manuales realizado por Hernández (2008, 2011), en flores masculinas de *O. robusta*, *E. coccineus* y *E. polyacanthus*, encontró granos de polen germinando en el estigma reducido de estas flores, sin embargo, sólo observó tubos polínicos creciendo a través del tejido de transmisión en *O. robusta* y en *E. coccinues*, pero en menor cantidad que en las flores femeninas.

Un resultado interesante en la presente investigación a nivel del ovario, es que no hubo diferencias significativas en el promedio de óvulos producidos en flores masculinas, ya fuera ANA aplicada por inyección o mezclado en lanolina. Para la concentración de 5 μM de ANA en las flores de tipo 1 se obtuvo la *t-test*, $t= 0.6753$ ($df= 48$; $P= 0.2514$) y para las del tipo 2 una *t-test*, $t= 0.02558$ ($df= 48$; $P= 0.4898$). Mientras que para la concentración a 25 μM de ANA en las flores del tipo 1 la prueba Kruskal-Wallis fue de 3.56 ($P= 0.168$), para las de tipo 2, la $K-W= 4.79$; $P= 0.0912$) y en las de tipo 3 una *t-test*, $t= 0.3683$ ($df= 35$; $P= 0.3574$). Los resultados similares con ambos métodos estarían indicando que el transporte de auxina a lo largo del gineceo no se encuentra tan afectado.

Por otra parte, al no presentarse diferencias significativas en el promedio de óvulos por ovario entre las flores masculinas tratadas con las distintas concentraciones de ANA (5 μM y 25 μM), podría indicar que las flores tuvieron diferentes concentraciones de auxinas endógenas, por lo que al aplicarlas exógenamente, la suma tanto de auxinas endógenas y exógenas pudieron ser similares o cercanas. Sin dejar de lado que a la concentración de 25 μM se obtuvo un mayor grado en el desarrollo de los óvulos.

Modelo del desarrollo de flores masculinas en *O. stenopetala*

El siguiente modelo sugiere la posible explicación de la acción simultánea de las auxinas y otras moléculas para especificar las diferentes zonas del gineceo durante su formación en las flores de *O. stenopetala*.

En la flor femenina (Fig. 24A), con un gineceo funcional, el gen *OstSTY* homólogo al gen *STY1* de *Arabidopsis thaliana* (Orozco, 2012), actúa como un factor transcripcional promoviendo la expresión de los genes tipo *YUCCA* (especialmente a *YUC2* y/o *YUC4*), involucrados en la vía de la biosíntesis de la auxina (Cheng *et al.*, 2006; Sohlberg *et al.*, 2006; Ståldal *et al.*, 2008; Eklund *et al.*, 2010). Se ha propuesto para *A. thaliana*, un patrón apical-basal del gineceo que es dependiente de un gradiente de auxinas. Las auxinas se sintetizan en la parte apical del estilo y se transportan basipétamente formando un gradiente decreciente. Conforme a esta hipótesis, los niveles altos de auxinas promoverían la

diferenciación del estigma y el estilo, los niveles intermedios formarían el ovario, mientras que los niveles bajos formarían al ginóforo en esta especie (Nemhauser *et al.*, 2000). Los genes *SPATULA* (*SPT*, factor de transcripción bHLH) y *ETTIN* (*ETT*, factor de respuesta a auxinas) pueden estar involucrados para interpretar el gradiente de auxina durante el desarrollo del gineceo y traducirla a la activación/represión de genes diana, en sus respectivos dominios (Balanzá *et al.*, 2006; Sundberg y Ferrándiz, 2009). Sin embargo, en el gineceo de las flores de *O. stenopetala* no ha sido posible demostrar un gradiente de auxinas como tal (Orozco, 2012; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012).

En la flor masculina (Fig. 24B), la disminución del transcrito de *OstSTY* ocasiona que la tasa de síntesis de auxina disminuya, afectando su acumulación y el establecimiento del gradiente a lo largo del gineceo (Orozco, 2012). De tal manera, la auxina no alcanza los niveles de acumulación óptimos para activar a los genes que pudieran ser homólogos a los genes de *A. thaliana* *SPT* y *ETT* (si se encuentran presentes) para llevar a cabo los procesos de diferenciación del estigma, estilo, ovario y óvulos de una forma correcta. Al estar ausentes o reducidas algunas de estas estructuras del órgano femenino, la flor sólo desempeña la función masculina. Lo cual indicaría que la auxina actúe como un componente que regula la diferenciación de cada una de las partes que conforman al gineceo de las flores de *O. stenopetala* o que se compensa con otros factores con funciones similares. Por lo que se ha llegado a sugerir que si *OstSTY* desempeñara una función parecida a *STY* durante la morfogénesis del gineceo de *O. stenopetala*, la disminución de su transcrito que conlleva a una acumulación menor de auxinas en etapas temprana del desarrollo, este gen podría estar relacionado con el proceso de masculinización en *O. stenopetala* (Orozco-Arroyo *et al.*, 2012). Otro factor que puede estar implicado o llevar a la masculinización en esta especie, además de la disminución del transcrito de *OstSTY*. Es la no activación, disminución o la ausencia de factores de respuesta a auxinas (*ARFs*); como lo que ocurre en el desarrollo del androceo de diferentes mutantes de *A. thaliana* (en los *ARFs*) deficientes en la respuesta a auxinas, mostrando defectos en el desarrollo de los estambres (Ellis *et al.*, 2005; Nagpal *et al.*, 2005), lo que podría estar ocurriendo en el gineceo de flores silvestres masculinas de *O. stenopetala*.

Al aplicar auxina en el gineceo de flores masculinas en etapas tempranas del desarrollo de *O. stenopetala* (Fig. 24C), se revierten algunos de los defectos del gineceo, resultando un canal estilar más amplio, mayor cantidad de tejido de transmisión, un aumento en la diferenciación de los haces vasculares y el desarrollo de tejido estigmático, así como de la cavidad del ovario, de los primordios ovulares y mayor desarrollo de los óvulos. Esto se puede deber a que las células son capaces de responder a los estímulos de la auxina.

Sin embargo, no hay que descartar la implicación de otras moléculas que actúen simultáneamente con las auxinas para especificar las diferentes zonas del gineceo (apical-basal). El modelo de gradiente de auxina en el desarrollo del gineceo ha sido refinada hipotéticamente por la participación de un gradiente antagonista de citocininas (Østergaard, 2009), de tal manera que la función correspondiente de cada hormona antagonista establece tres dominios de desarrollo distintas: 1) las citocininas podrían formar un gradiente con el pico máximo en la parte inferior del gineceo de *A. thaliana*, especificando la formación del ginóforo, 2) mientras que niveles intermedios formarían el ovario y 3) bajos niveles inducirían la diferenciación del estigma y el estilo. Una de las evidencias que apoya la relevancia de las citocininas en el desarrollo del gineceo en *A. thaliana* ha sido propuesto por Bartrina *et al.* (2011), quienes demostraron que las citocininas regulan el tamaño final del gineceo y juegan un papel importante en la formación de primordios ovulares, basándose en el análisis del doble mutante *ckx3 ckx5* (genes que promueven la degradación de las citocininas) de *A. thaliana*. El doble mutante *ckx3 ckx5* presenta un mayor tamaño de los órganos florales y dos veces más óvulos que las plantas silvestres. En *Cucumis sativus*, el etileno es importante en la diferenciación del ovario y de los óvulos, ya que en las primeras etapas del desarrollo se acumula en la región donde surgirán los óvulos (Saito, 2007). Asimismo, se ha visto que los mutantes afectados en la síntesis de giberelinas tienen subdesarrollados los órganos florales. Por ejemplo en *A. thaliana* el mutante *ga-1-3* exhibe una reducida elongación de los pétalos, pistilo y filamentos (Wilson *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2004).

Por otra parte las auxinas juegan un papel importante en la identidad de las células que conforman al saco embrionario y se propone un gradiente en un eje micropilar-calazal, donde una concentración alta de auxinas especificaría a las sinérgidas, seguidas por la

ovocélula y las células que reciben una menor cantidad de auxinas se diferenciarían en antípodas (Pagnussat *et al.*, 2009).

Modelo del desarrollo de flores masculinas en *O. stenopetala*

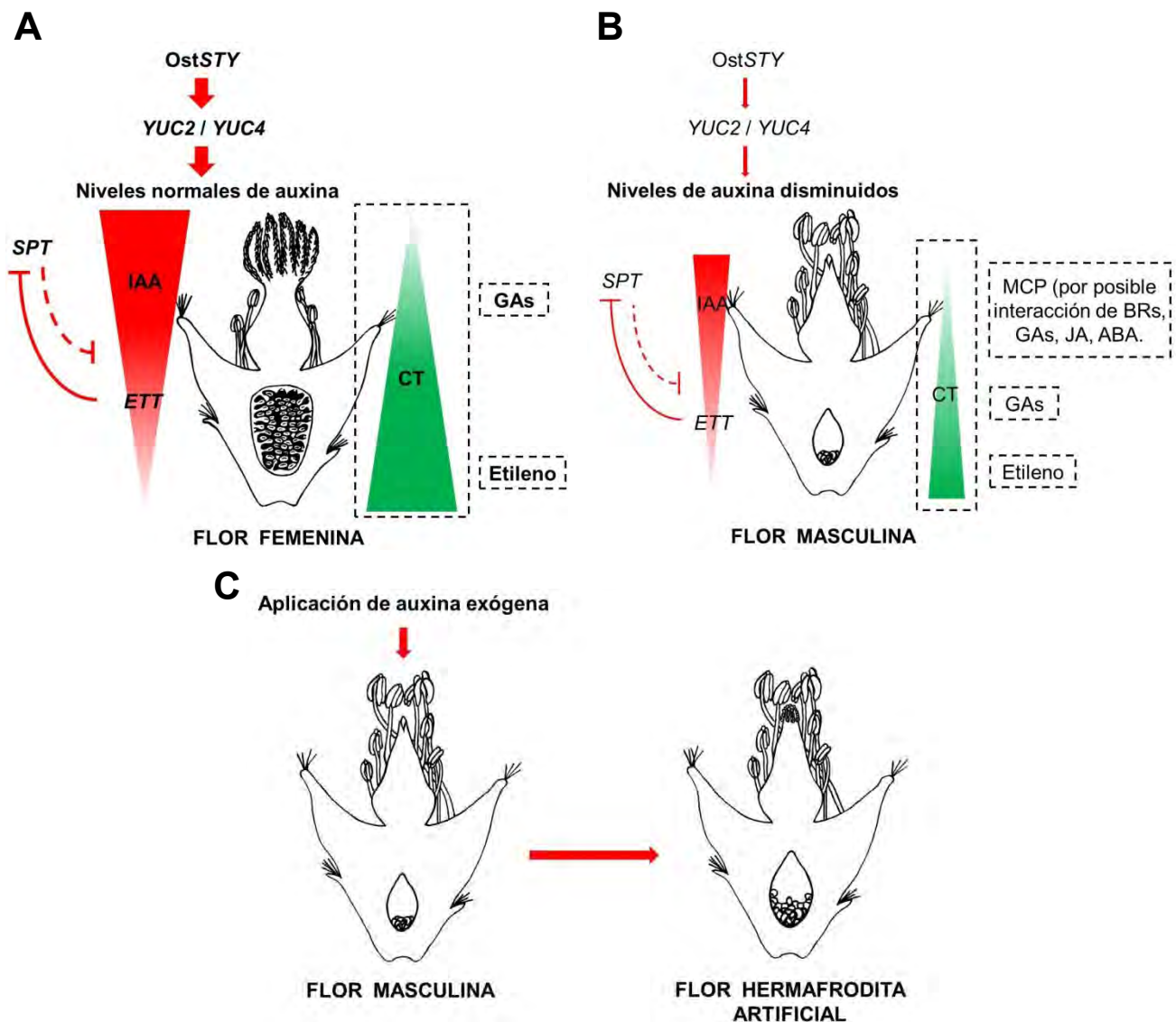


Figura 24. Modelo propuesto del desarrollo de las flores masculinas de *O. stenopetala* aumentado del modelo propuesto por Orozco (2012). **A)** En las flores femeninas OstSTY regula la síntesis de auxina a través de YUC2/YUC4 de modo que los niveles alcanzados resultan óptimos para la activación de SPT y ETT, para la formación correcta del gineceo. **B)** En las flores masculinas, los niveles bajos de OstSTY se afecta la expresión de YUC2/YUC4 y con ello la síntesis y acumulación de auxina, provocando que no se activen adecuadamente ni SPT ni ETT, resultando en un gineceo reducido. **C)** La aplicación exógena de auxina en etapas tempranas del desarrollo permite la reversión de los tejidos y parcialmente su función. Los recuadros discontinuos en A y B muestran posibles sustancias o procesos como muerte celular programada (MCP) implicados en el desarrollo del gineceo. **ABA:** ácido abscísico, **BRs:** brasinoesteroides, **CT:** citocinina, **GAs:** giberelina, **IAA:** auxina, **JA:** ácido jasmónico.

CONCLUSIONES

La microaplicación exógena manual de la auxina ácido 1-naftaleno acético (ANA) en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*, promovió la formación de tejido estigmático y la reversión parcial de sus funciones, ya que permite la adherencia, hidratación y germinación de los granos de polen. Además, se restituyeron algunos de los defectos en la estructura del estilo, resultando en una mayor diferenciación y número de haces vasculares, un aumento en el tejido de transmisión y un canal estilar más amplio. Mientras que a nivel del ovario, las flores del tipo 3 carente de él desarrollaron cavidades del ovario e incluso ocasionalmente primordios ovulares. En las flores del tipo 2 que presentan ovarios sin óvulos, se observó la diferenciación de primordios ovulares y óvulos con mayor desarrollo con respecto al control. Mientras que las flores del tipo 1 que poseen óvulos anormales en la base del ovario, tuvieron más óvulos y con mayor desarrollo, implicando la formación del saco embrionario (el cual no se desarrolla en el control).

El importante papel que tienen las auxinas durante el desarrollo del gineceo es evidente, por lo que se sugiere que modificaciones en la homeostasis de las auxinas juegan un papel fundamental en la evolución de la unisexualidad en *O. stenopetala*. En otras palabras, una acumulación baja de auxinas en etapas tempranas del desarrollo del gineceo lleva a una interrupción en la diferenciación y/o en el crecimiento de éste, originando flores estériles femeninas.

Es de suponerse que con un método más eficiente en la entrega y/o en la distribución de auxinas (por ejemplo, la inoculación) en etapas tempranas del desarrollo, sería posible permitir una recuperación completa del estilo, la formación del estigma y el desarrollo de óvulos en el gineceo de la flor masculina.

PERSPECTIVAS

Experimentar con un mejor método de aplicación de auxinas como el de inducción por bombardeo de plásmido o bien por expresión transitoria por medio de *Agrobacterium* con plásmido que contenga la inserción de OstSTY.

Aplicación de otras hormonas implicadas en el desarrollo del gineceo como citocininas, giberelinas y etileno.

Corroborar la presencia o ausencia de MCP a lo largo del gineceo (tejido de transmisión, funículos y placenta).

Buscar los transcritos corriente abajo de OstSTY, como los genes *YUCCA*, *ETT* y *SPT*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* **86**: 211-221.
- Acosta I. F., H. Laparra, S. P. Romero, E. Schmelz, M. Hamberg, J. P. Mottinger, M. A. Moreno y S. L. Dellaporta. 2009. *tasselseed1* is a lipoxxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science* **323**: 262–265.
- Alfaro A. I. 2008. Estudio de muerte celular programada durante el desarrollo de las anteras en flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* Engelmann y *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencia, UNAM. México, D. F. 61pp.
- Anderson E. F. 2001. The cactus family. Timber Press, Portiand, EUA.
- Ando S., Y. Sato, S. Kamachi y S. Sakai. 2001. Isolation of a MADS-box gene (*ERAF17*) and correlation of its expression with the induction of formation of female flowers by ethylene in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). *Planta*. **213**: 943-952.
- Areces-Mallea A. E. 1992. *Pereskia marcanoii*, a new species of Cactaceae from Hispaniola. *Brittonia* **44** (4): 423-428.
- Arreola H. J. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: Valle, C. (ed.) Suculentas mexicanas y cactáceas. CONABIO, SERMARNAP, 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.
- Balanzá V., M. Navarrete, M. Trigueros y C. Ferrándiz. 2006. Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *Journal of Experimental Botany* **57**(13): 3457-3469
- 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.
- Barrett S. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* **358**: 991-1004
- Bartrina I., E. Otto, M. Strnad, T. Werner y T. Schmülling. 2011. Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **23**: 69-80
- Bawa K. S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**: 15-39.
- Bawa K. S. y J. H. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68** (2): 254-274.
- Bennett S. R. M., J. Alvares, G. Bossinger y D. R. Smyth. 1995. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **8**: 505-520.
- Bhojwani S. S. y W. Y. Soh. 2001. Current Trends in the Embryology of Angiosperms. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. 1. UNAM. México. 743pp
- Calderón-Urrea A. y S. L. Dellaporta. 1999. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development*. **129**: 435-441.
- Camacho A. 2009. Desarrollo de la sflores masculinas de la especie dioica *Pereskia portulacifolia* (L.) DC. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencia, UNAM. México, D. F. 48pp.
- Caporali E., A. Carboni, M. G. Galli, G. Rossi, A. Spada y G. P. Marziani-Longo. 1994. Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual development pathway. *Sexual Plant Reproduction* **7**: 239–249.
- Caporali E., A. Spada, G. Marziani, O. Failla y A. Scienza. 2003. The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *VitisVinifera* ssp. *Silvestris*. *Sex Plant Reproduction* **15**: 291-300.

- Cecchetti V., M. M. Altamura, G. Falasca, P. Costantino y M. Cardarelli. 2008. Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* **20**: 1760–1774.
- Cheng H., L. Qin, S. Lee, X. Fu, D. E. Richards, D. Cao, D. Luo, N. P. Harberd y J. Peng. 2004. Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of *DELLA* protein function. *Development* **131**: 1055–1064.
- Cheng P. C., R. I. Greyson y D. B. Walden. 1983. Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Am J Bot* **70**: 450–462.
- Cheng Y., X. Dai y Y. Zhao. 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin mono-oxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**: 1790–1799.
- Clouse S. D. 2002. Brassinosteroids. The *Arabidopsis* Book.
- Coimbra S., L. Torrão y I. Abreu. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiol Biochem* **42**: 537–541.
- Cruz G. F., B. A. McClure, G. Busot, G. García, J. A. Juárez y L. T. Sánchez. 2001. Sistemas Genéticos de Reconocimiento del Polen en Angiospermas. En: Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Facultad de Química. UNAM. México, D. F. 135-146.
- Davies P. J. 2004. Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Del Castillo R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo. México. 133pp.
- Dellaporta S. L. y A. Calderón-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell* **5**: 1241-1251.
- Dellaporta S. L. y A. Calderón-Urrea. 1994. The sex determination process in maize. *Science* **266**: 1501-1505.
- DeLong A., A. Calderon-Urrea y S. L. Dellaporta. 1993. Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell* **74**: 757-768.
- Díaz L. y A. A. Cocucci. 2003. Functional gynodioecy in *Opuntia quimilo* (Cactaceae), a Tree cactus pollinated by bees and hummingbirds. *Plant Biology* **5**: 531-539.
- Eklund D. M., V. Staldal, I. Valsecchi, I. Cierlik, C. Eriksson, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi, J. F. Sundstro, M. Thelander, I. Ezcurra y E. Sundberg. 2010. The *Arabidopsis thaliana* *STYLISH1* protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *Plant Cell* **22**: 349–363.
- Ellis C.M., P. Nagpall, J. C. Young, G. Hagen, T. J. Guilfoyle y J. W. Reed. 2005. *Auxin Response Factor1* and *Auxin Response Factor2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**: 4563–4574.
- Feys B. J. F., C. E. Benedetti, C. N. Penfold y J. G. Turner. 1994. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751–759
- 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 LI. 2005. Esterilidad masculina en *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias (Biología experimental), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 87pp.
- Flores-Rentería LI., G. Orozco-Arroyo, F. Cruz-García, F. García-Campusano, I. Alfaro and S. Vázquez-Santana. 2013. Programmed cell death promotes male-sterility in the functional dioecious *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). *Annals of Botany* **112**: 789-800
- Golenberg E. M. y West N. W. 2013. Hormonal interactions and gene regulation can link monoecy and environmental plasticity to the evolution of dioecy in plants. *American Journal of Botany* **100(6)**: 1022-1037
- Greenberg, J.T. 1996. Programmed cell death: A way of life for Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12094-1209.
- Hardtke C. S. 2007. Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *Bioessays* **29**: 1115-1123.

- Hardtke C. S., E. Dorcey, K. S. Osmond y R. Sibout. 2007. Phytohormone collaboration: zooming in on auxin-brassinosteroid interactions. *Trends Cell Biol* **17**: 485-492.
- Hartwig T., G. S. Chuck, S. Fujioka, A. Klempien, R. Weizbauer, D. P. V. Potluri, S. Choe, G. S. Johal, B. Schulz. 2011. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proc Natl Acad Sci*. **108(49)**: 19814–19819.
- Hernández R. 2008. Estudio de la muerte celular programada en el gineceo de las flores masculinas de *Opuntia robusta* J. C. Wendl. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencia, UNAM. México, D. F. 72pp.
- Hernández R. 2011. Estudio comparativo de la sexualidad floral de *Echinocereus coccineus* y *Echinocereus polyacanthus* (Cactoideae: Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias (Biología experimental), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 78pp.
- Hoerberichts F. A. y E. J. Wilting. 2003. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bio Essays* **25**: 47–57.
- 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.
- Irish E. E., J. a. Langdale y T. M. Nelson. 1994. Interactions between Tassel Seed genes and other sex determining genes in maize. *Dev Genet* **15**: 155–171.
- Ito T., K. H. Ng, T. S. Lim, H. Yu y E. M. Meyerowitz .2007. The homeotic protein *AGAMOUS* controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3516–3529.
- Kamachi S., H. Sekimoto, N. Kondo y S. Sakai. 1997. Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Physiol* **38**: 1197–1206.
- Kimnach, M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus and Succulent Journal* **54**: 3-7.
- Krizek B. A. 2011. Auxin regulation of *Arabidopsis* flower development involves members of the AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT) family. *Journal of Experimental Botany* **62(10)**: 3311–3319.
- Kuusk S. 2003. Control of pistil development in *Arabidopsis thaliana* by a novel class of regulatory genes. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*. **827**. 50pp
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Long JA, Fridborg I y E. Sundberg. 2002. STY and STY2 promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis thaliana* gynoecium development. *Development* **129**: 4707-4717.
- Lam E. 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. **5**: 305-315.
- Lazarte J. E. y B. F. Palser. 1979. Morphology, vascular anatomy and embryology of pistillate and staminate flowers of *Asparagus officinalis*. *American Journal of Botany* **66**: 753–764.
- 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.
- López M., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. 2ª edición. Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 178pp.
- Mauseth J. D. 1995. *Botany. An Introduction to Plant Biology*. 2ª Edición. Saunders College Publishing. USA.
- McConn M. y J. Browse. 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* **8**: 403-416.
- Mitchell C. H. y P. K. Diggle. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *Am. J. Bot.* **92**: 1068–1076.
- Nagpal P., C. M. Ellis, H. Weber, S. E. Ploense, L. S. Barkawi, T. J. Guilfoyle, G. Hagen, J. M. Alonso, J. D. Cohen, E. E. Farmer, J. R. Ecker y J. Reed. 2005. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**: 4107–4118.

- Negrón-Ortiz V. y L. Strittmatter. 2004. Embryology of floral dimorphism and gender system of *Consoleacorallicola* (Cactaceae), a rare species of the Florida Keys. *Haseltonia* **10**: 16-25.
- Nemhauser J. L., Feldman L. J. y P. C. Zambryski. 2000. Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* **127**: 3877-3888.
- Noodén L. 2004. Plant cell death processes. Elsevier Academic Press. Netherlands. 392pp.
- Núñez M. C. 2004. Cactáceas columnares de México: estudio embriológico de cinco especies de la tribu *Pachycereeae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 178pp.
- Oeller P., M. Lu, L. Taylor, D. Pike y A. Theologis. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* **254**: 437-439.
- Ogawa, M., A. Hanada, Y. Yamauchi, A. Kuwahara, Y. Kamiya y S. Yamaguchi. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-604.
- Okada K., Ueda J., Komaki M. K., Bell C. J. y Y. Shimura. 1991. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**: 677-684.
- Orozco G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelm (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.
- Orozco G. 2012. Mecanismos Moleculares Involucrados en el desarrollo de flores masculinas de *Opuntia stenopetala*. Tesis de Doctorado en ciencias (Bioquímicas). Facultad de química, UNAM. México, D. F. 91pp.
- Orozco-Arroyo G., S. Vázquez-Santana, A. Camacho, J. G. Dubrovsky y F. Cruz-García. 2012. Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta* **236(1)**: 225-238.
- Østergaard L. 2009. Don't leaf now. The making of a fruit. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 1-6
- Pagnussat G. C., M. Alandete-Saez, J. L. Bowman y V. Sundaresan. 2009. Auxin-Dependent Patterning and Gamete Specification in the *Arabidopsis* Female Gametophyte. *SCIENCE* **324**: 1684-1689.
- Papadopoulou E., H. A. Little, S. A. Hammar y R. Grumet. 2005. Effect of modified endogenous ethylene production on sex expression, bisexual flower development and fruit production in melon (*Cucumis melo* L.). *Sex Plant Reprod* **18**: 131-142
- Perl-Treves R. 1999. Male to female conversion along the cucumber shoot: approaches to studying genes and floral development in *Cucumis sativus*. In: Ainsworth C. 1999. *Sex determination in plants*. Ed. Bios Scientific Publishers Oxford. 189-216 pp
- 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. *Am. J. Bot.* **82**: 596-606.
- Saito S., N. Fujii, Y. Miyazawa, S. Yamasaki, S. Matsuura, H. Mizusawa, Y. Fujita y H. Takahashi. 2007. Correlation between development of female flower buds and expression of the CS-ACS2 gene in cucumber plants. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2897-2907.
- Salman-Minkov A., A. Levi, S. Wolf y T. Trebitsh. 2008. ACC synthase genes are polymorphic in watermelon (*Citrullus* spp.) and differentially expressed in flowers and in response to auxin and gibberellin. *Plant Cell Physiol* **49**: 740-750.
- Sánchez D. 2007. Embriología de *Mammillaria dioica* K. Brandege (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 52pp
- Sanders P. M., P. Y. Lee, C. Biesgen, J. D. Boone, T. P. Beals, E. W. Weiler y R. B. Goldberg. 2000. The *Arabidopsis* *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell* **12**: 1041-1061.
- Scheinvar L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro: diversidad y riqueza. Fondo de Cultura Económica. México. 390pp
- Sessions A., Nemhauser J. L., McCall A., Roe J. L., Feldman K. A. y P. C. Zambryski. 1997. ETTIN patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**: 4481-4491.
- Sherry R. A., K. J. Eckard y E. M. Lord. 1993. Flower development in dioecious *Spinacia oleracea* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* **80(3)**: 283-291

- Silva, J. A. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 61pp.
- Sohlberg J. J., Myrenas M., Kuusk S., Lagercrantz U., Kowalczyk M., Sandberg G. y E. Sundberg. 2006. STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant Journal* **47**: 112-123.
- Ståldal V., Sohlberg J. J., Eklund D. M., Ljung K. y E. Sundberg. 2008. Auxin can act independently of *CRC*, *LUG*, *SEU*, *SPT* and *STY1* in style development but not apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *New Phytol* **180**: 798-808.
- Stintzi A. y J. Browse. 2000. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **97**: 10625–10630.
- 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.
- Strittmatter L., R. Hickey y V. Negrón-Ortiz. 2008. Heterochrony and its role in sex determination of cryptically dioecious *Consolea* (Cactaceae) staminate flowers. *Botanical Journal of the Linnean Society* **156**: 305-326.
- Sundberg E. y C. Ferrándiz. 2009. Gynoecium patterning in *Arabidopsis*: a basic plan behind a complex structure. Chapter 2. *Annual Plant Reviews* **38**: 35-69
- Sundberg E. y L. Østergaard. 2009. Distinct and Dynamic Auxin Activities During Reproductive Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001628
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 3th Ed. Simauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA. pp 690
- Thomson J. D. y S. C. Barrett. 1981. Selection for outcrossing, sexual selection and the evolution of dioecy in plants. *The American Naturalist* **118**: 443-449.
- Vivian-Smith A. y A. M. Koltunow. 1999. Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 437-51.
- Wilson R. N., J. W. Heckman y C. R. Somerville. 1992. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol* **100**: 403–408.
- Wu H. y Y. Cheung. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* **44**: 267-281.
- Wu X., S. Knapp, S. Stamp, D. K. Stammers, H. Jörnvall, S. L. Dellaporta y U. Oppermann. 2007. Biochemical characterization of *TASSELSEED2*, an essential plant short-chain dehydrogenase/reductase with broad spectrum activities. *FEBS JOURNAL* **274**: 1172–1182
- Yanofsky M. F., Ma. Hong, J.L. Bowman, G. N. Drews, K. A. Feldmann y E. M. Meyerowitz. 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* **346**: 35-39.
- Ye Q., W. Zhu, L. Li, S. Zhang, Y. Yin, H. Ma y X. Wenig. 2010. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 6100–6105.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en la revista *Planta*:

Orozco-Arroyo G., S. Vázquez-Santana, A. Camacho, J. G. Dubrovsky y F. Cruz-García. 2012. Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta* 236 (1): 225-238

Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*

Gregorio Orozco-Arroyo · Sonia Vázquez-Santana ·
Aldebaran Camacho · Joseph G. Dubrovsky ·
Felipe Cruz-García

Received: 6 December 2011 / Accepted: 26 January 2012 / Published online: 11 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract In *Opuntia stenopetala*, flowers initiate as hermaphrodite; however, at maturity, only the stamens in male flowers and the gynoecium in female flowers become functional. At early developmental stages, growth and morphogenesis of the gynoecium in male flowers cease, forming a short style lacking stigmatic tissue at maturity. Here, an analysis of the masculinization process of this species and its relationship with auxin metabolism during gynoecium morphogenesis is presented. Histological analysis and scanning electron microscopy were performed; auxin levels were immunoanalyzed and exogenous auxin was applied to developing gynoecia. Male flower style-tissue patterning revealed morphological defects in the vascular bundles, stylar canal, and transmitting tissue. These features are similar to those observed in

Arabidopsis thaliana mutant plants affected in auxin transport, metabolism, or signaling. Notably, when comparing auxin levels between male and female gynoecia from *O. stenopetala* at an early developmental stage, we found that they were particularly low in the male gynoecium. Consequently, exogenous auxin application on male gynoecia partially restored the defects of gynoecium development. We therefore hypothesize that, the arrest in male flower gynoecia patterning could be related to altered auxin homeostasis; alternatively, the addition of auxin could compensate for the lack of another unknown factor affecting male flower gynoecium development.

Keywords Auxin · Dioecy · Floral development · Gynoecium development · Reproductive biology · Unisexuality

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-012-1602-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. Orozco-Arroyo · F. Cruz-García (✉)
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. Universidad 3000. Col. Universidad Nacional
Autónoma de México, 04510 Mexico, D.F., Mexico
e-mail: fcg@unam.mx

S. Vázquez-Santana · A. Camacho
Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. Universidad 3000. Col. Universidad Nacional
Autónoma de México, 04510 Mexico, D.F., Mexico

J. G. Dubrovsky
Departamento de Biología Molecular de Plantas,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Introduction

The physical proximity of sexual organs in hermaphrodite flowers represents a self-pollination problem, which many species have solved by developing physical, physiological or genetic barriers to encourage out-crossing (for a review see Barret 2002). One of these strategies comprises the separation of male and female reproductive organs into different unisexual flowers, which may occur in the same (monoecy) or in different (dioecy) individuals (Delph 2009). Most dioecious species go through a hermaphroditic stage early in flower development, where the floral meristem contains both the stamen and carpel primordia (Ainsworth 2000; Mitchell and Diggle 2005). However, at more advanced stages, one of the sexual organs arrests its development before the other matures (Mitchell and Diggle 2005). Under this scenario, species with unisexual flowers

develop male flowers with rudiments of the gynoecium and female flowers with rudimentary stamens. Organ degeneration occurs at a precise and species-dependent developmental stage (Balk and Leaver 2001; Caporali et al. 2003; Coimbra et al. 2004), probably as a consequence of an alteration in the genetic pathway that regulates the molecular control of either gynoecium, or androecium growth and/or differentiation. Molecular control of flower development has been extensively studied, primarily in *A. thaliana*. Several mutations affecting *A. thaliana* gynoecium development have been described. Some of these affect gynoecium organ identity and others gynoecium tissue patterning, including marginal tissues as septum, placenta, ovules, style, and stigma. The plant hormone auxin has been revealed as an essential factor in the control of flower development, especially during gynoecium development, as demonstrated when polar auxin transport (PAT) or auxin signaling is inhibited (Okada et al. 1991; Bennett et al. 1995; Sessions et al. 1997; Zhao 2010). Nemhauser et al. (2000) demonstrated that when PAT is impaired, several structural defects, including those in the apical and basal regions of the gynoecium, emerge.

In angiosperms, unisexuality seems to have evolved independently in different lineages (Renner and Ricklefs 1995). In the Cactaceae family, to date, there are 26 reported species, distributed among three of the four subfamilies, which develop unisexual flowers (Table S1). Most of these show non-functional vestiges of the opposite sex at anthesis (Lindsay and Dawson 1952; Bravo-Hollis 1978; Kimnach 1982; Leuenberger 1986; Del Castillo and González 1988; Hoffman 1992; Fleming et al. 1994; Valiente-Banuet et al. 1997; Strittmatter et al. 2002). The study of the mechanisms involved in unisexuality in Cactaceae species is an attractive model system because early evolutionary stages of the unisexuality process can be observed, probably due to the relatively recent origin of this family (Hershkovitz and Zimmer 1997; Nyffeler 2002; Edwards et al. 2005). Most of the previous work on unisexuality has focused on ecological aspects (Del Castillo 1986; Fleming et al. 1994) and embryological studies of dioecious species are scarce. In fact, only the subdioecious cactus *Consolea spinosissima* has been studied at morphological and embryological level (Strittmatter et al. 2002, 2008). Natural populations of *C. spinosissima* display three floral morphs: male, female, and weak hermaphrodite (morphologically hermaphrodite flowers in which ovules at anthesis are papery). All morphs start their development as a hermaphrodite, although at maturity only the male and female morphs are differentiated as unisexual individuals (Strittmatter et al. 2002). Regardless of this valuable information, more physiological and developmental information is needed to elucidate the evolutive forces that lead to unisexuality in Cactaceae.

In this work we report the early stages of male flower development in the dioecious cactus *O. stenopetala* Englem and their relationship with auxin homeostasis. The data showed an arrest in gynoecium morphogenesis that leads to a decrease in ovary size, ovule abortion, and a lack of stigmatic tissue formation, which together lead to the loss of the female function. The male flower gynoecium exhibits poor differentiation in vascular bundles and a diminished amount of both transmitting tissue and stylar canal. These defects are commonly observed in mutant plants defective in auxin homeostasis. Indeed, quantification by immunodetection of the main auxin, indole-3-acetic acid (IAA), revealed that at a stage prior to stigma formation, IAA content was greater in female than in male gynoecia. Furthermore, exogenous application of auxin to male flower developing gynoecia promoted stigmatic tissue formation, reverting some morphogenetic defects in the stylar structure and stimulating ovule development in ovaries of male flowers. Our data indicate that gynoecium developmental arrest in male flowers may be a consequence of lower auxin levels, which concomitantly affect gynoecium patterning and morphogenesis.

Materials and methods

Plant material

Opuntia stenopetala plants were sampled in Querétaro, Mexico. An area of 8,000 m² was analyzed and 98 plants in bloom were found. All flowering individuals were sexed at anthesis based on the terminology of Sakai and Weller (1999). In brief, plants were considered male when bearing staminate flowers, and female when bearing pistillate flowers. At anthesis staminate flowers were recognized because its gynoecium presents no stigmatic lobes and a reduced/absent ovary. The ovary filled with ovules and the presence of a multi-lobed stigma was used to recognize female flowers. At least three flowers per individual were analyzed to determine its gender. Based on the length of the floral bud, three main stages of development were defined: (1) buds from 7 to 9.5 mm were defined as early development, (2) buds from 14 to 17.5 mm as middle development, and (3) floral anthesis as the mature development stage.

Histology and scanning electron microscopy

Flowers and floral buds at different developmental stages were fixed in FAA (formalin:acetic acid:50% alcohol 1:2:17) for light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Plant material was dehydrated in an ascending series of ethanol and embedded in either Paraplast plus (Leica) or LR-White resin (Electron Microscopy Sciences).

The Paraplast sections were 7–12 μm thick, and the LR-White sections were 1–2 μm thick. Both section types were stained with safranin and fast-green, or with 0.01% toluidine blue. Histological analysis was performed in at least five gynoecia per gender. For the SEM studies, buds and flowers at anthesis were dissected to expose the sexual organs. Fixed material was dehydrated to critical point by an ethanol series and CO_2 , mounted, coated with gold and observed in either a Jeol JSM-5310LV or Hitachi S-2460N scanning electron microscope. For clarity, digital images were artificially colored using Adobe Photoshop Version 10 (Adobe Systems Inc.).

Indole-3-acetic acid (IAA) immunodetection

Male and female floral buds from different developmental stages and flowers at anthesis were fixed for 4 h at 4°C with aqueous 3% (w/v) *N*-(3-dimethylethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide-HCl (Sigma) and then with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After dehydration in a graded series of ethanol, the tissues were embedded in Paraplast, sectioned at 10 μm thickness and mounted on Superfrost microscope slides (Fisher). The sections were dewaxed in SlideBrite (Biocare Medical), hydrated in a decreasing ethanol series and rinsed in PBS. The sections were incubated in blocking solution (3% bovine albumin serum, 0.1% Triton X-100, in PBS) for 4 h at 4°C and then, incubated for 16 h with the monoclonal anti-IAA antibody (Sigma) at a 1:50 dilution. Indole 3-acetic acid was detected with secondary antibodies labeled with Alexa 568 (Invitrogen). Control sections were prepared following the same procedure, although either the primary antibody, the secondary antibody or both antibodies were omitted. Immunofluorescence was analyzed by a confocal laser-scanning microscope (Olympus FV-1000). For each analyzed stage, three male and three female flowers from three different plants were used to perform the IAA immunolocalization and the result of one representative experiment is shown. The fluorescence intensity of the IAA signal was measured using Macnification software, version 1.7.1 (Orbicle). From each analyzed gynoecium, three apical, three medial, and three basal areas were selected. Fluorescence intensity values were averaged and standardized to the corresponding female flowers gynoecia sections.

Local auxin applications

Micro-applications of auxin were performed as described by Reinhardt et al. (2000). In brief, 100 μM 1-naphthaleneacetic acid (NAA; Sigma) prepared from a DMSO-based stock solution was diluted in pre-warmed (50°C) lanolin containing 2.5% paraffin to reach final concentrations of 5 and 25 μM NAA in a resulting lanolin paste.

1-naphthaleneacetic acid was preferred over other synthetic or natural auxin molecules because of its membrane diffusion properties (Delbarre et al. 1996), which make it more suitable to use on the thick cuticle of cacti epidermal cells. The negative control treatment was performed only with the lanolin/paraffin mixture supplemented with DMSO concentrations corresponding to those in lanolin paste. Male and female plants with floral buds at the middle development stage, growing in natural populations, were selected and buds were partially dissected to expose the styler and stigmatic tissues. The lanolin paste was manually administered to the apical ends of the developing gynoecia with a micro spatula. The buds were then covered with the tissue that was previously removed. Stems carrying the treated floral buds were removed from the plant, and then transferred to and maintained under greenhouse conditions. After 7 days, gynoecia were dissected and prepared for SEM analysis or histological sections as described above. The 5- and 25- μM NAA applications were performed in 14 and 22 male floral buds, respectively.

Injections with 50 μl of 5 or 25 μM NAA at the base of the ovary were performed in 23 and 41 male floral buds, respectively, from male plants with an incomplete ovule development. The NAA treatments were injected to out-of-sight ovaries and ovules at middle stage of floral development. After 7 days, the ovaries were dissected and prepared for SEM analysis.

Results

Opuntia stenopetala sexual dimorphism in natural populations

The cactus *O. stenopetala* produces male and female flowers in separate individuals, thus forming dioecious populations (Fig. 1a). To determine the gender distribution in the field, the *O. stenopetala* population was sexed. A total of 60 male and 38 female plants were counted. Female plants produced only pistillate flowers (Fig. 1b), and presented a gynoecium with a style bearing between 6 and 12 stigmatic lobes, which are covered with multiple stigmatic papillae at the top. In these flowers, the gynoecium is situated above the non-functional stamens, which lack pollen grains. Only female plants were capable of setting fruit. Male individuals only produced staminate flowers (Fig. 1c) that possessed an androecium with viable pollen grains. The gynoecium was positioned under the stamens and displayed a reduced style without any stigmatic lobes or stigmatic papillae.

As many species that develop unisexual flowers (Mitchell and Diggle 2005), male and female flower buds of *O. stenopetala* initiate their development with both stamen and carpel primordia. In early developmental stages, female and male



Fig. 1 *Opuntia stenopetala*. **a** Plant in natural population. **b** Apical view of a female flower. **c** Lateral view of a male flower

buds were very similar to each other (Fig. 2a, b, respectively) with stamen primordia surrounding carpel primordia. However, later in development, although the androecium was morphologically similar in both types of flowers, the gynoecium showed considerable differences. In female flowers, we observed that the apex of the carpel primordia fused to form the style, and cell division occurred in the uppermost region to form the stigmatic tissue with papillary cells (Fig. 2c). In contrast, carpel fusion was incomplete in the apical region of the gynoecium of male flowers; instead, slight bifurcations were detected in the style apex (Fig. 2d). At anthesis, female flowers possessed a conspicuous stigma (Fig. 2e); however, in all of the male flowers analyzed ($n \approx 500$, Fig. 2f), the gynoecium was reduced and the stigma was absent (Fig. 3f–h). Regarding the androecium, at anthesis male flower anthers (Fig. 2f) produced pollen, although anthers of female flowers did not and appear to have collapsed.

Female flowers presented just one morph, characterized by a well-developed gynoecium (Fig. 3a, e, i) and collapsed anthers without pollen (Fig. 3e). In male flowers, three floral morphs could be distinguished, although only one type of floral morph was produced per male plant (Fig. 3b–d). When compared with the female flower (Fig. 3i), the predominant male floral morph ($\sim 60\%$ of individuals) was characterized by a considerably reduced ovary with a small number of incompletely developed ovules at its base (Fig. 3j). A second male flower morph ($\sim 30\%$ of individuals) presented empty ovaries (Fig. 3k); while the remaining male individuals ($\sim 10\%$) exhibited a greatly reduced ovary with a very slim crack instead (Fig. 3l).

Sexual differentiation of style-tissue patterning and structure

To determine the differences in style-tissue pattern and structure between mature male and mature female flowers, histological sections of the basal, middle, and apical

regions of the style were analyzed in mature flowers. At the base of the style in female flowers, the outermost layer corresponded to an epidermis, followed by a subepidermal layer and the cortical parenchyma, which contained vascular bundles (Fig. 4a). At the center, a group of small cells form the transmitting tissue that defines the stylar canal, which was barely open at this level. In the cortex, a few cells with presumably mucilaginous content, characterized by a dense staining, could be observed. In male flowers, the basal region of the style was composed of the same cell strata observed in the female flower style but with conspicuous differences (Fig. 4d). Most of the cells in the cortex were filled with mucilage, and were larger than those observed in styles of the female flowers. Transmitting tissue and vascular bundles were not easy to identify because they were reduced and not fully differentiated (arrowheads in Fig. 4d). In contrast, vascular bundles were formed at the periphery of the transmitting tissue, i.e., closer to the style center than those in female flowers.

Sections from the middle region of the style showed that in female flowers, the stylar canal had reached its maximum area and was lined by an epidermis and a well-developed transmitting tissue characterized by small, tightly packed cells (Fig. 4b). Within the stylar canal, the epidermal cells were intensely stained, resembling stigmatic papillae. In male flowers, median region sections of the style (Fig. 4e) showed maintenance of an organization very similar to that observed in the basal sections (Fig. 4d), exhibiting transmitting tissue and vascular bundles that remained difficult to distinguish.

The apical part of the female flower style diverged to form the stigmatic lobes, where epidermal cells gave rise to stigmatic papillae, which were intensely stained (Fig. 4c). In contrast, transverse sections of the style apex in male flowers revealed that the carpels did not fully fuse at this point and the stigmatic tissue was not formed (Fig. 4f).

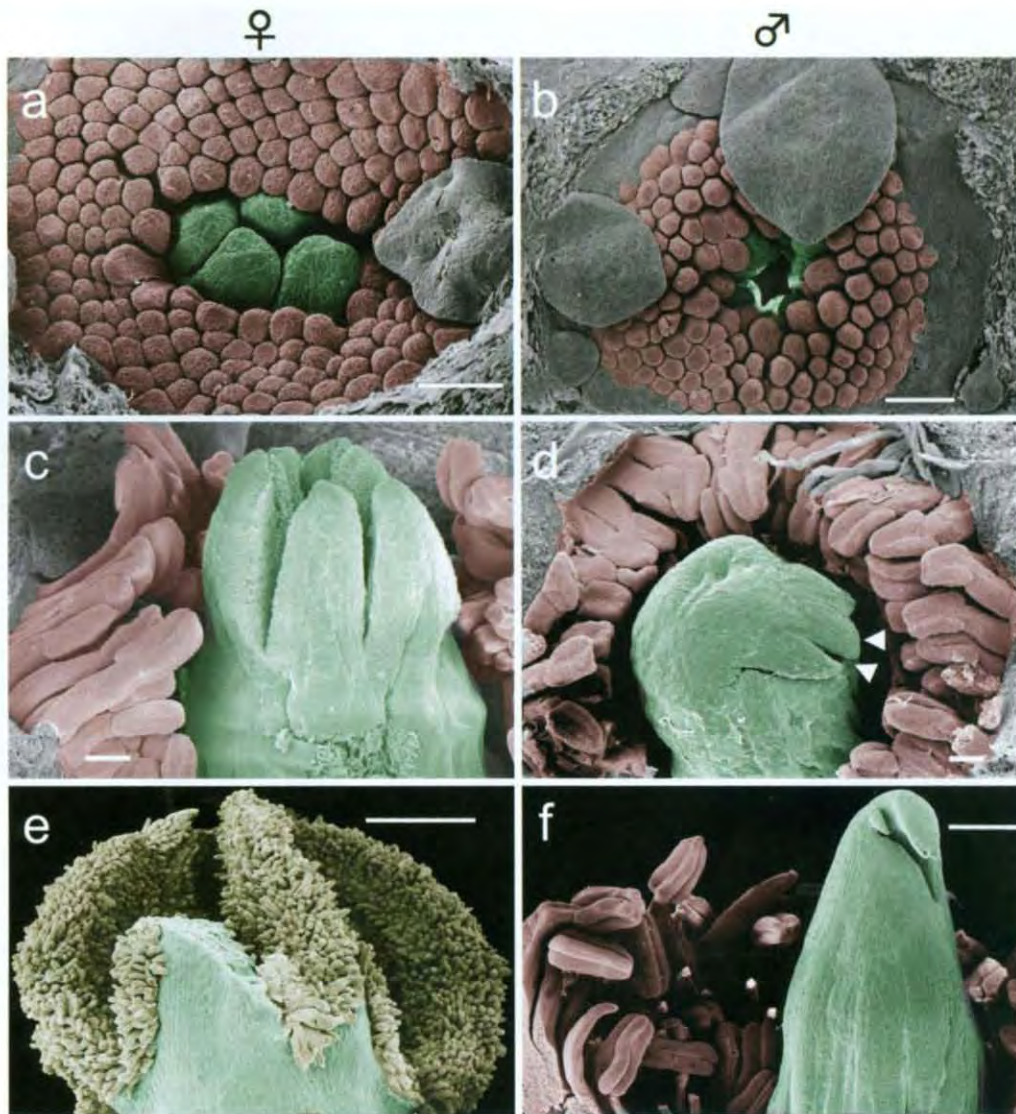


Fig. 2 Flower development in *O. stenopetala*. **a, b** Early flower development. **a** The female floral bud. The stamen (*red*) and carpel (*green*) primordia are initiated. **b** The male floral bud showing the stamen primordia (*red*), which surround the central and incompletely unfused carpel primordia (*green*). **c, d** The middle stage of flower development. **c** The female floral bud. The style has branched at the apex to form the stigmatic lobes (*green*). **d** The male floral bud. The

stigmatic tissue is not developed, instead, slight bifurcations (*arrow-head*) are observed at the apex. **e, f** The apical region of mature flower gynoecia. **e** The female flower gynoecium. The style (*green*) branches to produce stigmatic tissue (*yellow*). **f** The male flower gynoecium. The style (*green*) has arrested its development, and no stigmatic tissue is visible. The stamens (*red*) are fully developed. Bars 100 μm (**a–d**), 500 μm (**e, f**)

Ovule development in *O. stenopetala*

In the female flowers, small protuberances arise from the placentae arranged in a double row (Fig. 5a). The growth of these nucelli results in its bending, at the time that the outer and inner integuments start to differentiate (Fig. 5b). Later in development, the funiculus begins to encase the ovule (Fig. 5c) until completely enclosed it (Fig. 5d). At maturity,

female flower ovules are campylotropous. In male flowers that develop ovules, few protuberances, nucellus-like, emerge only at the base of the ovary (Fig. 5e, f). These ovule primordia remain undifferentiated until anthesis (Fig. 6c). Notably, after analyzing around 50 mature male flowers from different plants, we found the formation of the integuments in the ovule primordia in only two individual plants (Fig. 5g). No further stages of development were detected.

Fig. 3 Floral morphs in a natural population of *O. stenopetala*. **a–d** A schematic representation of the female (**a**) and the three male (**b–d**) floral morphs. **e–l** SEM images of the female morph showing the style and stigma (**green**) and stamens (**red**, **e**) and male morph showing the style without stigma (**f–h**). The ovary in female flowers is filled with ovules (**violet**, **i**). The size of the ovaries in male flowers is different in the three floral morphs: a reduced ovary with few, non-functional ovules at the base (**violet**, **j**), a reduced empty ovary (**k**) or no ovary (**l**). The percentage of plants bearing each morph is indicated. Bars 1 mm (**e**, **i**), 200 μ m (**f–h**), 500 μ m (**j–l**)

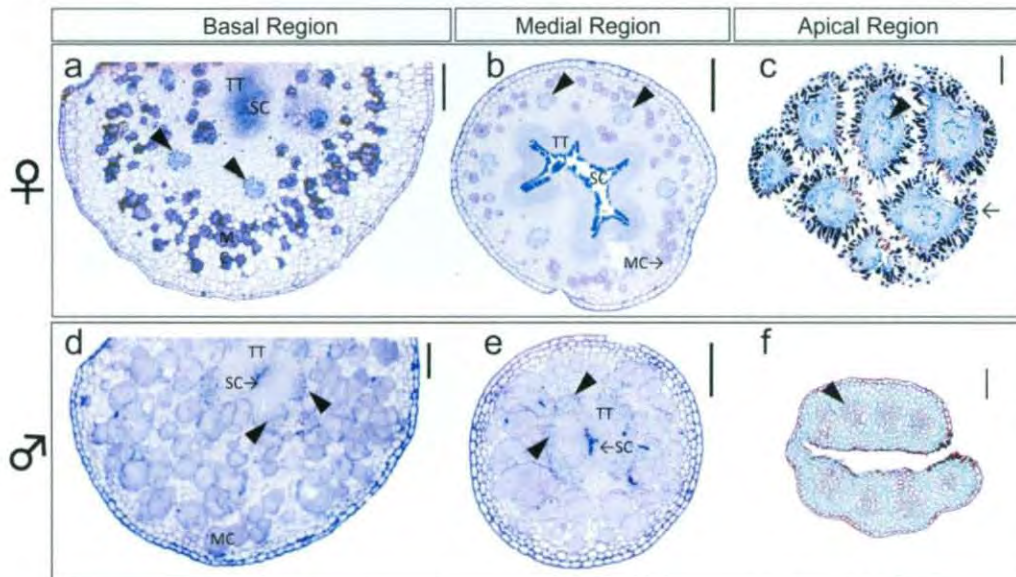
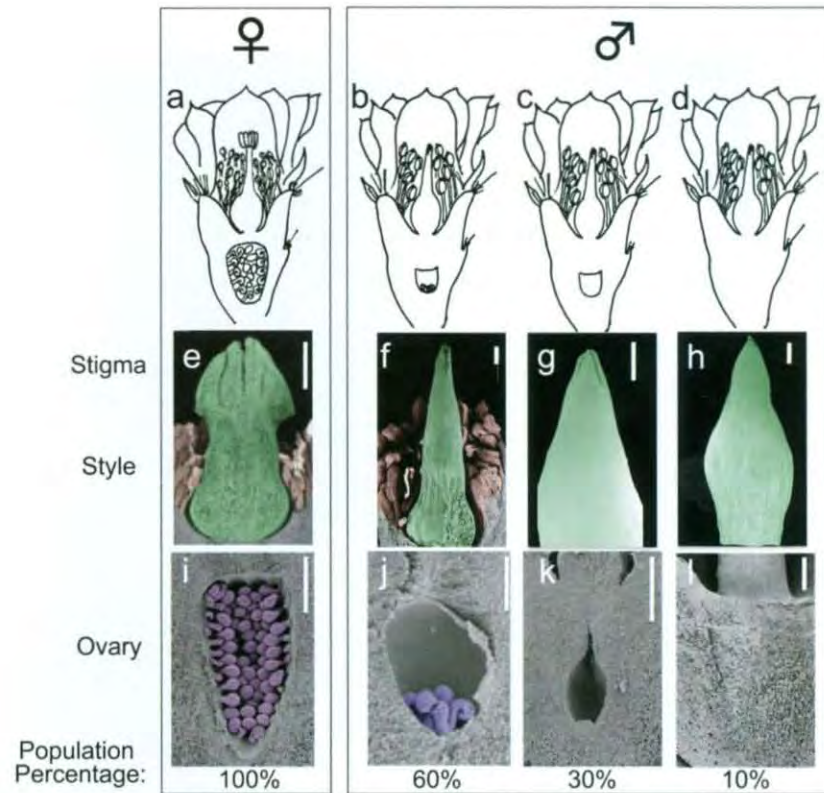


Fig. 4 Tissue patterning differences between styles in male and female flowers. **a–c** The style in female flowers. **a** In the basal region. Arrow mucilage cells. **b** The median region is almost identical to the basal one. **c** In apical region. Arrow stigmatic lobes covered by stigmatic papillae. **d–f** The style in male flowers. **d** In the basal region

(**e**) in the medial style region (**f**) and in the apical region. Arrowheads indicate the position of vascular bundles in (**a**)–(**f**). SC stylar canal, TT transmitting tissue, MC mucilage cell. Bars 100 μ m (**c**, **f**), 200 μ m (**a**, **b**, **d**, **e**)

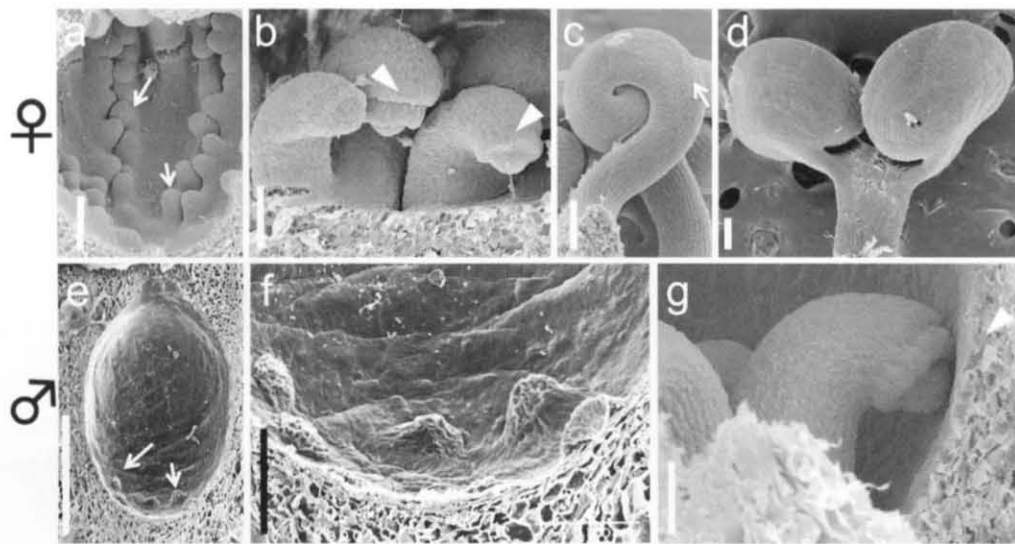


Fig. 5 Ovule development in *O. stenopetala*. **a–d** Ovule development in female flowers. **a** Emergence of several nucellus (arrows) from the placenta. **b** Inner and outer integument (arrowheads) development in ovule primordia. **c** Funiculus (arrow) starts to grow and covers the rest of the ovule. **d** Mature ovules with encasing

funiculus. **e–g** Ovule development in male flowers. **e** Emergence of some nucellus (arrows) only at the base of the ovary. **f** Close-up of **(e)**. **g** At anthesis ovules in few flowers have integuments primordia (arrowhead). Bars 100 μm (**a**, **c**, **d**, **f**), 50 μm (**b**, **g**), 500 μm (**e**)

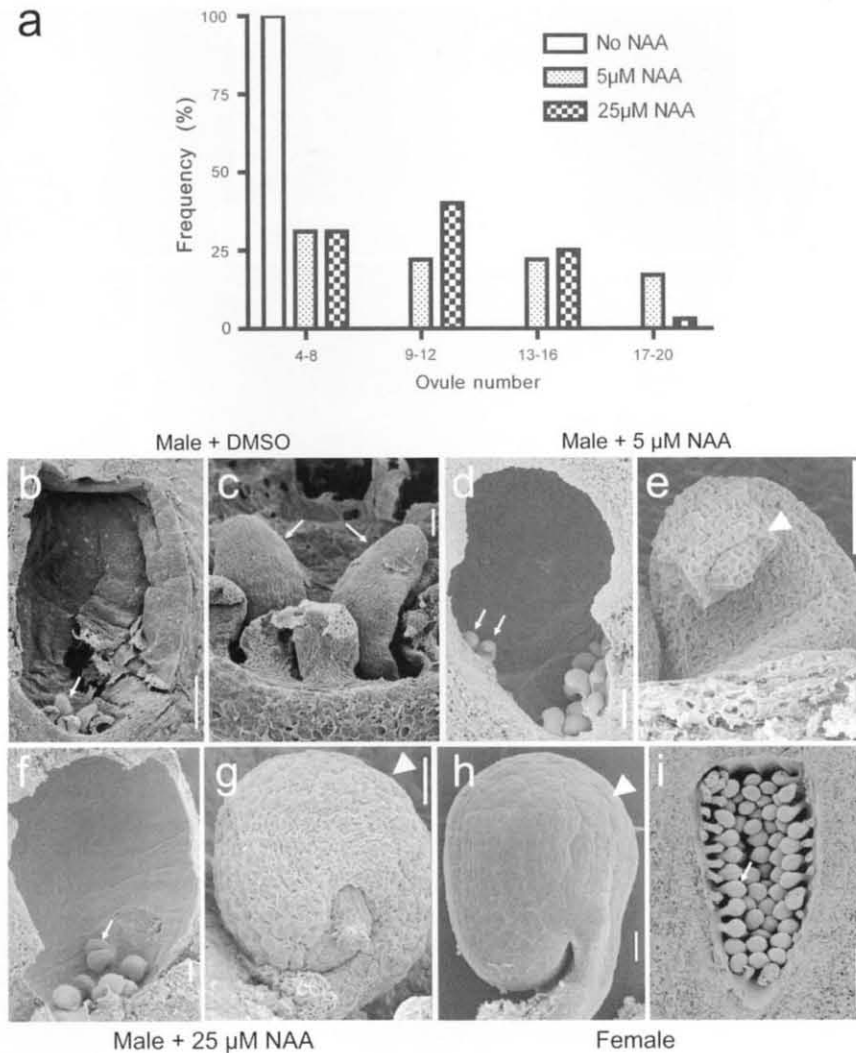
Endogenous IAA content at an early developmental stage is greater in the gynoecium of female flowers than in male flowers

Our histological analysis demonstrated that the flower style radial patterning is essentially similar in both female and male flowers; however, marginal tissues (i.e., style and stigma) within the male flower gynoecium did not fully undergo differentiation. Nemhauser et al. (2000) described similar gynoecium malformations in *A. thaliana* plants, where PAT was chemically inhibited. To investigate the possible role of auxin in the masculinization process in *O. stenopetala*, we analyzed the endogenous levels of IAA in gynoecia and correlated them with the male or female flower phenotypes. Thus, we hypothesized that if auxin has a preponderant role in *O. stenopetala* gynoecium development, as it does in *A. thaliana*, changes in auxin homeostasis could be associated with the gynoecium arrest of differentiation in male flowers. To test if IAA was actually involved in the masculinization process of *O. stenopetala* flowers, IAA was quantified by immunodetection (Avsian-Kretchmer et al. 2002; Sakata et al. 2010). When carpel primordia were close to fusing, female floral buds (Fig. 7a) showed a slightly stronger IAA signal than the male floral buds (Fig. 7b). In a more advanced developmental stage, the situation becomes more pronounced because the gynoecia in female flowers showed a considerable increase in IAA signal compared with the sterile gynoecia in the male

flowers (Fig. 7c, d, respectively). Therefore, these data indicate differences in the auxin levels between gynoecia of male and female flowers at early developmental stages when the styles of female flowers have initiated stigmatic tissue differentiation. However, at the middle stage of development, the intensity and distribution of the IAA immunofluorescence signal was similar in female and male gynoecia (Fig. 7e, f). Similar results were observed in gynoecia at a mature stage (Fig. 7g, h). Control male and female tissue sections were prepared but omitted either the use of the primary antibody (Fig. 7i), the use of the secondary antibody (Fig. 7j) or of both (Fig. 7k). None of these tissue sections showed IAA signal. Quantification of the IAA signals in these images clearly demonstrates that only at early developmental stage the IAA content in male flower gynoecia is significantly reduced (45% lower, Fig. 7l) if compared with the female flower gynoecium.

The lower auxin amount in early stages of male flower gynoecia compared to those of female flowers in *O. stenopetala*, might be the consequence of upstream mutations that affect biosynthesis-related genes such as *STYLISH1* (*STY1*), a *SHORT INTERNODES* (*SHI*) genic family member (Kuusk et al. 2002). Although our molecular data are still in progress, we have evidence that *OstSRS* (*O. stenopetala* *SHI* RELATED SEQUENCE), a putative homologue of *A. thaliana* *STY1*, shows a lower level of expression in the gynoecia of male flowers of *O. stenopetala* compared with female flowers (Fig. S1).

Fig. 6 Auxin promotes ovule development in male floral buds. **a** Frequency percentage of ovule emergence induction after treatment with 5 μM ($n = 24$ ovaries) and 25 μM ($n = 18$ ovaries) NAA compared with control ovaries ($n = 50$). **b–i** SEM images of ovaries and ovules. **b** Control treatment without NAA. **c** Close-up of (**b**). **d** Treated ovary with 5 μM NAA. *Arrows* indicate ovules growing from lateral wall of the ovary. **e** Close-up of (**d**). **f** Treated ovary with 25 μM NAA. **g** Close-up of (**f**) showing that funiculus (*arrowhead*) almost envelops the ovule. Close-up of an ovule (**h**) and an ovary (**i**) from a typical mature female flower. Twenty-three ovaries were treated with 5 μM NAA and 12 presented a positive effect. Forty-one ovaries were treated with 25 μM NAA and 24 presented a positive effect. *Arrows* ovules. *Bars* 200 μm (**b, c, e**), 50 μm (**d, f, g, h**), 1 mm (**i**)

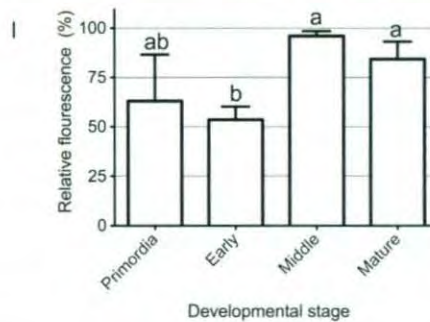
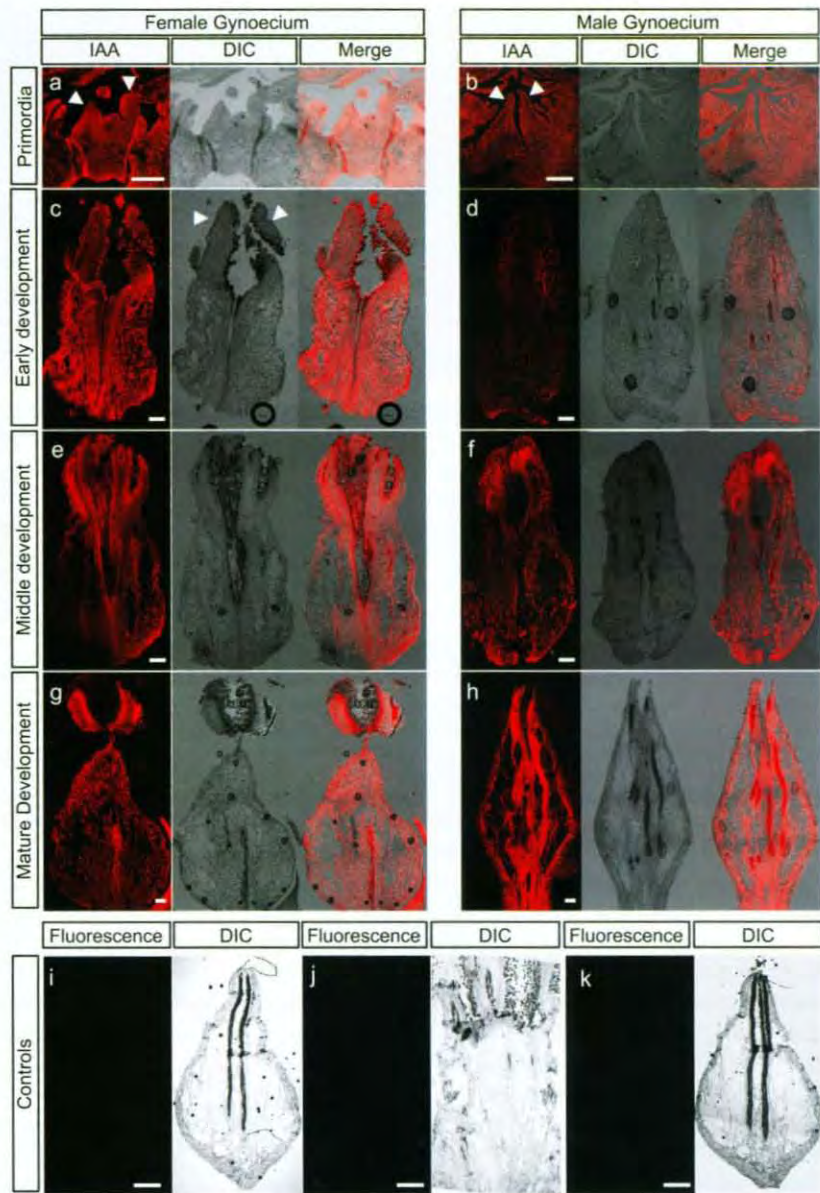


Exogenous auxin application partially reverted the male flower gynoecium defects

Even though the difference in auxin concentration between male and female gynoecia cannot be accurately quantified from the above results, this outcome suggests that at an early developmental stage, a larger amount of auxin is present in the gynoecia of female flowers. This could be related to their successful gynoecium morphogenesis, whereas the lower auxin amount in the gynoecia of male flowers could cause its developmental arrest. If so, a local auxin application to early developing gynoecia of male flowers could be sufficient for, or at least would assist in, proper morphogenesis. To test this possibility, apical regions of male flower gynoecia at an early stage of

development were externally treated with NAA. Auxin applications in carpel primordia were technically impossible. Styles with the control treatment (lanolin paste without NAA) retained the stigmaless phenotype of male flowers (Fig. 8a). Notably, the addition of 5 μM NAA induced a slight branching in the apex of the style (Fig. 8b, c). When applying 25 μM NAA, a prominent phenotype was observed with the formation of structures similar to the stigmatic lobes of female flower gynoecia (Fig. 8d). In some styles treated with 25 μM NAA, a partial restoration of the apical tissues occurred due to the development of cells that resembled the stigmatic papillae of female flower gynoecia (arrowhead in Fig. 8d). These stigmatic-like tissues were formed in patches arising at the center of the style, in the middle of the recently formed stigmatic lobes.

Fig. 7 The immunodetection of IAA reveals differences between gynoecia of male and female flowers during stigma development. **a, b** Carpel primordia. **a** Female floral bud with carpel primordia (arrowheads) prior to fusing. **b** Male floral bud, carpel primordia (arrowheads) are about to fuse. **c, d** The early stage of development. **c** The gynoecium in female flower, note the formation of stigmatic tissue at the apex (arrowheads). **d** The gynoecium in male flowers, the immunofluorescence signal intensity is decreased when compared with the gynoecium in female flowers. **e, f** Gynoecia at the middle developmental stage. **e** of the female flower and **f** of the male flower. **g, h** Gynoecia at mature stage (anthesis), **g** of the female flower and **h** of the male flower. **i–k** Control sections. **i** The gynoecium of the male flower, which the antibody against IAA, **j** secondary antibody or **k** both, were omitted. **l** Relative fluorescence of the IAA signal intensity at different stages of development. Female flower gynoecia IAA intensity values were taken as a 100% of fluorescence; the corresponding values of the male flowers gynoecia were plotted as a relative fluorescence. *Error bars* indicate standard error. Values followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$) when compared with female flower gynoecium sections. Analysis was made by a Tukey multiple comparison test after a one-way ANOVA ($n = 3$). *Bars* 200 μm (**a–h**), 500 μm (**i–k**)



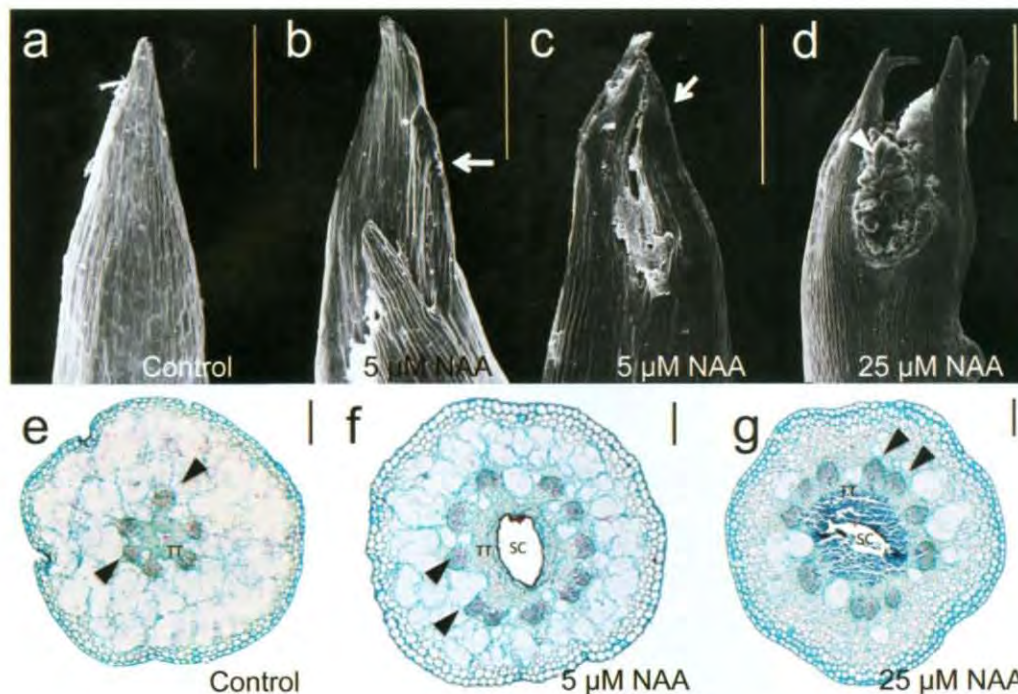


Fig. 8 Exogenous auxin application partially reverts the stigmaless male flower phenotype and promotes gynoecium tissue patterning of the female type. **a–d** SEM images of the apical region of the style in male flower. **a** The control treatment with no NAA. **b–d** Treatments with 5 μM NAA (**b, c**); note a slight ramification (*arrows*) of the apex (**d**). Treatment with 25 μM NAA induces the ramification of the

stigma and production of stigmatic cells (*arrowhead*). **e–g** Transverse sections of the median region of the styles in male flowers. **e** Control treatment without NAA. In styles treated with 5 μM NAA (**f**) and 25 μM NAA (**g**), *arrowheads* vascular bundles. Bars 500 μm (**a, d**), 400 μm (**b, c**), 200 μm (**e–g**)

Histological sections revealed that some defects in the medial style of male flowers were also partially reverted when exogenous auxin was applied. The tissue patterning and external appearance of styles after the control treatment (Fig. 8e) was similar to those from untreated styles (Fig. 4e). However, styles in male flowers treated with 5 and 25 μM NAA (Fig. 8f, g, respectively) showed histological features that resembled female flower styles, including the presence of intensely stained cells around the stylar canal. In treated styles, the transmitting tissue increased in area and exhibited a more delineated tissue pattern, as well as a greater number of vascular bundles (arrowheads in Fig. 8f, g), which had differentiated to a more advanced stage, when compared to untreated styles of male flowers. However, no changes were observed in the ovary morphology after auxin application on the apical part of the style (data not shown). To eliminate the possibility that auxin application on the style apex had only a local effect; a direct injection of NAA to developing ovaries of male and female floral buds was carried out. To determine the precise NAA effect in ovule development, male flowers with an ovary that presented a low number of ovules in its

base and an arrest in their development, were selected (Fig. 3j). When NAA was injected to ovaries from male flowers, a slight increase in the number of ovules and in the ovary size was observed after 5- and 25-μM NAA applications with respect to untreated control ovaries (Fig. 6a). These additional ovules developed from the lateral walls of the ovary (Fig. 6d) and show further development as an inner integument emerged surrounding the nucellus (Fig. 6e). Remarkably, when 25 μM NAA was applied, a considerable improvement in ovule development was observed and the amount of ovules also increased (Fig. 6f). Under this treatment, the funiculus was enlarged and almost enveloped the rest of the ovule (Fig. 6g). Its external morphology resembled that observed in mature ovules of female flowers (Fig. 6h, i), even though the ovule number in female flowers remains larger (Fig. 6i). In male flowers, ovaries and ovules injected with DMSO suffered neither morphological change nor was the ovule number increased (Fig. 6b, c).

These experiments showed that local auxin treatment was able to restore some of the morphogenetic defects in the male flower gynoecium.

Discussion

Sexual dimorphism in flower development in *O. stenopetala*

We described the gynoecium morphogenesis in male and female flowers of *O. stenopetala*. Male flowers in this dioecious species are formed by the cessation of gynoecium development, which occurs during late flower development. A similar situation is also observed in male and female flowers of the subdioecious *C. spinosissima*, where there is cease of development of the alternative sex whorl at a late stage of development, leaving non-functional sex organs (Strittmatter et al. 2002). In *O. stenopetala*, these events involved failures of the differentiation processes within the male flower gynoecium tissues, resulting in a lack of stigmatic tissue. In addition, male flowers exhibited a range of defects in ovary and ovule development, which resulted from variation in the degree of cessation of differentiation. These phenotypic variations suggest that in *O. stenopetala*, even when functional dioecism is established, the ovaries in male flowers could be in transition to loss the ovary cavity to reinforce the loss of female function and behave as a male flower. In contrast, the presence of a style without a stigma in male flowers is already a stable trait because of its consistency in all of the three morphs described. In Cactaceae, the developmental pattern that produces unisexual flowers in *C. spinosissima* and *O. stenopetala* has significant differences. In *C. spinosissima* and five other species of the genus *Consolea*, male flowers present a well-developed stigma, style and ovary; the female sterility is attributable to ovule abortion (Strittmatter et al. 2002, 2008). In contrast, in *O. stenopetala* the inability of male flowers to set fruits is clearly due to the incomplete ovule development or the total absence of ovules, in combination with the lack of stigma and stilar defects.

Hormones and sex determination processes in angiosperms

In angiosperm species whose male flowers present a vestigial gynoecium, female sterility has been associated with morphological defects that could be due to the absence or malformation of the stigma, the style or the ovules. These developmental failures in male flowers have been clarified in some unisexual species as maize (Cheng et al. 1983; Dellaporta and Calderon-Urrea 1993; Chuck et al. 2007) and in some Cucurbitaceae species such as *Cucumis sativus* (Chuck 2010).

Flowers in maize initiate as hermaphrodites, but later in flower development, one sexual whorl undergoes abortion. Male flowers originate when the initial gynoecium cells

disintegrate after become highly vacuolated (Cheng et al. 1983). Calderon-Urrea and Dellaporta (1999) demonstrated that the gynoecium cell death is a developmentally programmed cell process where nuclear fragmentation is involved. This masculinization process in maize is partially under the control of *tasselseed1 (ts1)* and *ts2* genes (Irish et al. 1994). *ts1* encodes a lipoxygenase apparently involved in the jasmonic acid biosynthesis pathway (Acosta et al. 2009); meanwhile *ts2* encodes a hydroxysteroid dehydrogenase probably implied in the biosynthetic pathway of brassinosteroids (Wu et al. 2007). Brassinosteroids could modulate the synthesis of jasmonic acid and gibberellins (Wu et al. 2007), both of which have been shown to be involved in programmed cell death (Hoerberichts and Wltering 2003), a tightly controlled process of cell death functioning in multiple developmental programs, included unisexual flower development (*Helianthus annuus*, Balk and Leaver 2001; *Actinidia deliciosa*, Coimbra et al. 2004). Interestingly, Hartwig et al. (2011) recently demonstrated that brassinosteroids promote stamen development in male maize flowers and proposed an active role of brassinosteroids in triggering gynoecium primordia degeneration.

Similar characteristics to maize unisexual floral developmental are reported in other members of the Andropogoneae grass tribe (Le Roux and Kellogg 1999). Other Poaceae family species, meanwhile, seem to have a different mechanism of male flower development, as noted in *Zizania aquatica* (Zaitchik et al. 2000) and *Bouteloua dimorpha* (Kinney et al. 2008), therefore a single developmental pattern of masculinization could not been established for grasses.

Cucurbitaceae is another plant family with multiple species bearing unisexual flowers. In monoecious cucumber (*Cucumis sativus*), treatment with ethylene causes a feminizing effect (Perl-Treves 1999). Interestingly, ethylene up-regulates the *CS-ACS* (1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid synthase) genes, involved in the ethylene biosynthetic pathway (Oeller et al. 1991) in monoecious and gynodioecious plants, but not in andromonoecious species (Kamachi et al. 1997; Yamasaki et al. 2003). Furthermore *CS-ACS2* mRNA accumulation closely correlates with female flower expression in the cucumber (Kamachi et al. 1997). However, the feminizing effect of ethylene is not universal to all the unisexual cucurbits, because in watermelon (*Citrullus* spp.) ethylene has a masculinizing effect (Salman-Minkov et al. 2008).

In several plants, hormones are clearly involved in sex determination processes; accordingly, the sex determining genes could be involved in both of their biosynthetic pathways or in a variety of other signaling pathways influenced by hormones.

Auxin and masculinization in *O. stenopetala*

Our results in *O. stenopetala* suggest that the male flower gynoecium exhibits a reduction in auxin concentration at early developmental stages that may contribute to disrupting its tissue patterning. Nemhauser et al. (2000) proposed a model that considers that auxin biosynthesis occurs at the gynoecium apical region and is transported basipetally throughout the gynoecium. It is thought that the formation of this gradient promotes regional patterning in gynoecium development: high auxin levels will induce style and stigma differentiation, while lower auxin levels will be critical for the normal development of the ovary and the gynophore. Moreover, the formation and maintenance of this gradient will depend on the auxin synthesis rate, its conjugation, and its active polar transport (Alabadí et al. 2009). Our data support the key role of auxin in sustaining gynoecium development although we have no evidence of the establishment and maintenance of an auxin gradient.

Our preliminary results suggest that a putative auxin-related biosynthesis gene, *OstSRS*, could be related with the masculinization process in *O. stenopetala*. Our working hypothesis is that this diminished *OstSRS* mRNA level could be linked to the lower auxin content detected by immunohistochemistry at an early developmental stage. Since molecular studies in *O. stenopetala* are difficult, until now, we could not gain deeper insight into the molecular processes that control auxin biosynthesis in this species. *OstSRS* is a homolog of *A. thaliana* *STY1*, this is very relevant since Ståldal et al. (2008) suggest that *STY1* acts as a transcriptional activator of *YUCCA4* (*YUC4*), a homolog of *YUC1*, which is a gene involved in auxin biosynthesis (Marsch-Martinez et al. 2002; Kuusk et al. 2006; Sohlberg et al. 2006; Eklund et al. 2010; Stepanova et al. 2011). If *OstSRS* accomplish a similar function as *STY* during *O. stenopetala* gynoecium development remains to be proven. Interestingly, exogenous auxin application restores the style phenotype of *A. thaliana* *sty1-1 sty2-1* double mutants, suggesting that mutant plants exhibit a reduction in the auxin synthesis (Ståldal et al. 2008). Exogenous auxin application to apical parts of the gynoecium significantly promoted stigmatic tissue formation and reverted some of the defects in the median style structure observed in the *O. stenopetala* male flower gynoecium. Presumably, with a more accurate auxin delivery method (e.g., inoculation) at earlier stages of development, it would be possible to allow a full recovery of style and stigma formation in male gynoecia. Our results indicate that auxin either acts as a factor that regulate style and stigma differentiation for male flower gynoecia development or that it compensates for another factor with similar role.

Apical auxin applications did not restore neither ovary nor ovule development, suggesting that male gynoecium cells could also be defective in auxin transport. However, further research must be performed to get a deeper insight about this possibility. Yet, we know that in male flowers, ovaries with a reduced number of ovules respond to direct auxin application at early developmental stages, even when only 50% of the treated ovaries reassumed ovule development. This low percentage could be a partial consequence of technical difficulties that did not allow the accurate delivery of NAA into the ovary chamber. Taken together, these results suggest that cells in male-flower ovaries have the ability to respond to auxin, reassuming ovule development. Even when auxin partially recovers male flower style and ovule development, none of the separate treatments was effective in restoring fertility. However, a combinatory auxin application with a less-invasive method, on both ovules and style, might reestablish female fertility on male flowers.

The central role of auxin in gynoecium development is undeniable; however, other molecules could act in parallel with auxin to specify the different apical–basal regions of the gynoecium. Østergaard (2009) hypothesized that cytokinin could form a gradient with the maximum peak at the bottom of the *A. thaliana* gynoecium, specifying ovary and gynophore formation. Evidence that supports the importance of cytokinins in *A. thaliana* gynoecium development has been provided by Bartrina et al. (2011) who demonstrated that cytokinins regulate the final gynoecium size and participate in ovule primordia formation. Subsequent work must be performed to shed light on the dynamics of these hormones (and others, such as the gibberellins) in the regulatory pathways required for development of specific tissues (Sundberg and Ferrándiz 2009) and whether they are associated with unisexual flower developmental programs.

Here we show a connection between auxin and the formation of unisexual flowers, and propose that auxin metabolism has played an important role in the evolution of unisexuality in *O. stenopetala*. Thus, future work should be focused on accurately quantifying differences in auxin levels between male and female gynoecia at early developmental stages and linking these hormone alterations with mutations of auxin biosynthesis genes, such as *STY*-like genes, *YUCCA* (Zhao 2010), *NGATHA* (Trigueros et al. 2009), etc., or other gynoecium development-related genes in male flowers, such as *TOUSLED* (Roe et al. 1993), *SPATULA* (Heisler et al. 2001) or *HECATE* (Gremski et al. 2007), which are essential for cell proliferation and differentiation of the marginal tissues (i.e., transmitting tract, style, stigma, and placenta). This information will contribute importantly to the understanding of the mechanisms involved in dioecious evolution in angiosperms.

Acknowledgments The authors are grateful to Silvia Espinosa and Berenit Mendoza for SEM work, to Laurel Fábila for greenhouse assistance, to Javier Andres Juárez-Díaz, Florencia García-Campusano and Andrew Beacham for assistance in preparing the manuscript. This work was supported by Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM (Grant Numbers IN216105, IN226808, IN205009) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant Numbers 101771, 81968).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Acosta IF, Laparra H, Romero SP, Schmelz E, Hamberg M, Mottinger JP, Moreno MA, Dellaporta SL (2009) *tasselseed1* is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science* 323:262–265
- Ainsworth C (2000) Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Ann Bot* 86:211–221
- Alabadí D, Blázquez MA, Carbonell J, Ferrándiz C, Pérez-Amador MA (2009) Instructive roles for hormones in plant development. *Int J Dev Biol* 53:1597–1608
- Avsian-Kretschmer O, Cheng JC, Chen L, Moctezuma E, Sung ZR (2002) Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during *Arabidopsis* leaf ontogeny. *Plant Physiol* 130:199–209
- Balk J, Leaver CJ (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *Plant Cell* 13:1803–1818
- Barret SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nat Rev Genet* 3:274–284
- Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schmülling T (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:69–80
- Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR (1995) Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8:505–520
- Bravo-Hollis H (1978) Las Cactáceas de México. vol I, Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Calderon-Urrea A, Dellaporta SL (1999) Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* 126:435–441
- Caporali E, Spada A, Marziani G, Failla O, Scienza A (2003) The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp *silvestris*. *Sex Plant Reprod* 15:291–300
- Cheng PC, Greyson RI, Walden DB (1983) Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Am J Bot* 70:450–462
- Chuck G (2010) Molecular mechanisms of sex determination in monoecious and dioecious plants. *Adv Bot Res* 54:53–83
- Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S (2007) The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6* and *indeterminate spikelet1*. *Nat Genet* 39:1517–1521
- Coimbra S, Torrão L, Abreu I (2004) Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiol Biochem* 42:537–541
- Del Castillo R (1986) La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México, p 133
- Del Castillo RF, González M (1988) Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71:185–196
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198:532–541
- Dellaporta SL, Calderon-Urrea A (1993) Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5:1241–1251
- Delph LF (2009) Sex allocation: evolution to and from dioecy. *Curr Biol* 19:R249–R251
- Edwards EJ, Nyffeler R, Donoghue MJ (2005) Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *Am J Bot* 92:1177–1188
- Eklund DM, Staldal V, Valsecchi I, Cierlik I, Eriksson C, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Sundstro JF, Thelander M, Ezcurra I, Sundberg E (2010) The *Arabidopsis thaliana* STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *Plant Cell* 22:349–363
- Fleming TH, Maurice S, Buchmann SL, Tuttle MD (1994) Reproductive biology and the relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Am J Bot* 81:858–867
- Gremski K, Ditta G, Yanofsky MF (2007) *HECATE* genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134:3593–3601
- Hartwig T, Chuck GS, Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri DPV, Choe S, Johal GS, Schulz B (2011) Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proc Natl Acad Sci* doi: 10.1073/pnas.1108359108
- Heisler MGB, Atkinson A, Bylstra YH, Walsh R, Smyth DR (2001) *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* 128:1089–1098
- Hershkovitz MA, Zimmer EA (1997) On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon* 46:217–232
- Hoerberichs FA, Wltering EJ (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays* 25:47–57
- Hoffman MT (1992) Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. *Am J Bot* 79:1382–1388
- Irish EE, Langdale JA, Nelson TM (1994) Interactions between *Tassel Seed* genes and other sex determining genes in maize. *Dev Genet* 15:155–171
- Kamachi S, Sekimoto H, Kondo N, Sakai S (1997) Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Physiol* 38:1197–1206
- Kimnach M (1982) *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus Succul J US* 54:3–7
- Kinney MS, Columbus JT, Friar EA (2008) Unisexual flower, spikelet, and inflorescence development in monoecious/dioecious *Bouteloua dimorpha* (Poaceae, Chloridoideae). *Am J Bot* 95:123–132
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Long JA, Fridborg I, Sundberg E (2002) *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development* 129:4707–4717
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Eklund DM, Sundberg E (2006) Functionally redundant *SHI* family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J* 47:99–111
- Le Roux LG, Kellogg EA (1999) Floral development and the formation of unisexual spikelets in the Andropogoneae (Poaceae). *Am J Bot* 86:354–366

- Leuenberger B (1986) *Pereskia* (Cactaceae). Mem N Y Bot Gard 41:1–141
- Lindsay G, Dawson E (1952) Mammillarias of the islands off northwestern Baja California, Mexico. Cactus Succul J US 24:76–84
- Marsch-Martinez N, Greco R, Van Arkel G, Herrera-Estrella L, Pereira A (2002) Activation tagging using the *En-1* maize transposon system in *Arabidopsis*. Plant Physiol 129:1544–1556
- Mitchell CH, Diggle PK (2005) The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. Am J Bot 92:1068–1076
- Nemhauser JL, Feldman LJ, Zambryski PC (2000) Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. Development 127:3877–3888
- Nyffeler R (2002) Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. Am J Bot 89:312–326
- Oeller P, Lu M, Taylor L, Pike D, Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science 254:437–439
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. Plant Cell 3:677–684
- Østergaard L (2009) Don't 'leaf' now. The making of a fruit. Curr Opin Plant Biol 12:36–41
- Perl-Treves R (1999) Male to female conversion along the cucumber shoot: approaches to studying genes and floral development in *Cucumis sativus*. In: Ainsworth C (ed) Sex determination in plants. Bios Scientific Publishers Oxford, pp 189–216
- Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. Plant Cell 12:507–518
- Renner SS, Ricklefs RE (1995) Dioecy and its correlates in the flowering plants. Am J Bot 82:596–606
- Roe JL, Rivin CJ, Sessions RA, Feldmann KA, Zambryski PC (1993) The *Tousled* gene in *A thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. Cell 75:939–950
- Sakai AK, Weller SG (1999) Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. In: Geber M, Dawson T, Delph L (eds) Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Springer, Germany, pp 1–31
- Sakata T, Oshino T, Miura S, Tomabechi M, Tsunaga Y, Higashitani N, Miyazawa Y, Takahashi H, Watanabe M, Higashitani A (2010) Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. Proc Natl Acad Sci USA 107:8569–8574
- Salman-Minkov A, Levi A, Wolf S, Trebitsh T (2008) ACC synthase genes are polymorphic in watermelon (*Citrullus* spp.) and differentially expressed in flowers and in response to auxin and gibberellin. Plant Cell Physiol 49:740–750
- Sessions RA, Nemhauser JL, McCall A, Roe JL, Feldmann KA, Zambryski PC (1997) *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. Development 124:4481–4491
- Sohlberg JJ, Myrenas M, Kuusk S, Lagercrantz U, Kowalczyk M, Sandberg G, Sundberg E (2006) *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. Plant J 47:112–123
- Ståldal V, Sohlberg JJ, Eklund DM, Ljung K, Sundberg E (2008) Auxin can act independently of *CRC*, *LUG*, *SEU*, *SPT* and *STY1* in style development but not apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. New Phytol 180:798–808
- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM (2011) The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. Plant Cell. doi:10.1105/tpc.111.088047
- Strittmatter LI, Negrón-Ortiz V, Hickey RJ (2002) Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. Am J Bot 89:1373–1387
- Strittmatter LI, Hickey RJ, Negrón-Ortiz V (2008) Heterochrony and its role in sex determination of cryptically dioecious *Consolea* (Cactaceae) staminate flowers. Bot J Linn Soc 156:305–326
- Sundberg E, Ferrándiz C (2009) Gynoecium patterning in *Arabidopsis*: a basic plan behind a complex structure. Annu Plant Rev 38:35–69
- Trigueros M, Navarrete-Gómez M, Sato S, Christensen SK, Weigel D, Yanofsky MF, Ferrándiz C (2009) The *NGATHA* genes direct style development in the *Arabidopsis* gynoecium. Plant Cell 21:1394–1409
- Valiente-Banuet A, Rojas-Martínez A, Arizmendi MC, Dávila P (1997) Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. Am J Bot 84:452–455
- Wu X, Knapp S, Stamp S, Stammers DK, Jörnvall H, Dellaporta SL, Oppermann U (2007) Biochemical characterization of TASSEL-SEED2, an essential plant short-chain dehydrogenase/reductase with broad spectrum activities. FEBS J 274:1172–1182
- Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H (2003) Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants. Sex Plant Reprod 16:103–111
- Zaitchik BF, LeRoux LG, Kellogg EA (2000) Development of male flowers in *Zizania aquatic* (North American wild-rice; Gramineae). Int J Plant Sci 161:345–351
- Zhao Y (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annu Rev Plant Biol 61:49–64

ANEXOS

Anexo 1. Lista de especies de cactáceas descritas con poblaciones que presentan un sistema reproductivo distinto al hermafrodita. Modificado de Orozco-Arroyo *et al.* (2012).

Especie	Sistema sexual	Referencia
Subfamilia Pereskioideae		
<i>Pereskia zinniiflora</i>	Dioica	(Leuenberger, 1986)
<i>P. portulacifolia</i>	Dioica	(Leuenberger, 1986; Camacho 2009)
<i>P. quisqueyana</i>	Androdioico	(Leuenberger, 1986)
<i>P. marcanoii</i>	Dioica	(Areces-Mallea, 1992)
Subfamilia Opuntioideae		
<i>Opuntia stenopetala</i> ≈ <i>O. glaucescens</i>	Dioica	(Bravo-Hollis, 1978; Orozco, 2002)
<i>O. robusta</i>	Dioica o Trioica	(Del Castillo, 1986; Silva, 2007)
<i>O. quimilo</i>	Ginodioico	(Díaz y Cocucci, 2003)
<i>O. quitensis</i>	Dioico	(Anderson, 2001)
<i>Consolea spinosissima</i>	Subdioica o Dioico	(Strittmatter y Negrón Ortiz, 2000; Strittmatter <i>et al.</i> , 2002, 2006, 2008)
<i>C. corallicola</i>	Dioico	(Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004)
<i>C. rubescens</i>	Dioico	(Strittmatter y Negrón Ortiz, 2000; Strittmatter <i>et al.</i> , 2006, 2008)
<i>C. millspaughii</i>	Dioico	(Strittmatter <i>et al.</i> , 2006, 2008)
<i>C. moniliformis</i>	Dioico	(Strittmatter <i>et al.</i> , 2006, 2008)
<i>C. nashii</i>	Dioico	(Strittmatter <i>et al.</i> , 2006, 2008)
<i>C. picardae</i>	Dioico	(Strittmatter <i>et al.</i> , 2006, 2008)
<i>Cylindropuntia molesta</i>	Ginodioico	(Rebman y Pinkava, 2001)
<i>C. calmalliana</i>	Ginodioico	(Rebman y Pinkava, 2001)
<i>C. sanfelipensis</i> ≈ <i>O. sanfelipensis</i>	Ginodioico	(Rebman, 1998)
<i>C. wolfii</i> ≈ <i>O. wolfei</i>	Ginodioico	(Rebman, 1998)
Subfamilia Cactoideae		
<i>Selenicereus innesii</i>	Ginodioico	(Kimnach, 1982)
<i>Pachycereus pringlei</i>	Trioico y Ginodioico	(Fleming <i>et al.</i> , 1994)
<i>Mammillaria dioica</i>	Ginodioico o Trioico	(Lindsay y Dawson, 1952; Sánchez, 2007)
<i>M. neopalmeri</i>	Ginodioico o Trioico	(Lindsay y Dawson, 1952)
<i>Echinocereus coccineus</i>	Dioico	(Hoffman, 1992; Hernández, 2011)
<i>E. mombergerianus</i>	Trioico	(Rebman, 2003, en Baker, 2006)
<i>E. yavapaiensis</i>	Dioico	(Baker, 2006)
<i>E. polyacanthus</i>	Dioico	(Hernández, 2011)

Anexo 2. Lista de especies que responden a aplicaciones exógenas o que se ven afectadas en la síntesis de hormonas, ocasionando cambios en su sexualidad. Modificado de Golenberg y West (2013 y citas ahí).

Especie	Hormona	Efecto
<i>Cannabis sativa</i>	Auxina	Feminización
<i>Cucumis sativus</i>	Auxina	Feminización
<i>Silene pendula</i>	Auxina	Feminización
<i>Opuntia stenopetala</i>	Auxina	Feminización
<i>Spinacia oleracea</i>	Auxina	Feminización
<i>Humulus lupulus</i>	Auxina	Masculinización
<i>Mercurialis annua</i>	Auxina	Masculinización
<i>Cleome spinosa</i>	Auxina	Masculinización
<i>Coriandrum sativum</i>	Giberelina	Feminización
<i>Hyoscyamus niger</i>	Giberelina	Feminización
<i>Luffa acutángula</i>	Giberelina	Feminización
<i>Zea mays</i>	Giberelina	Feminización
<i>Cannabis sativa</i>	Giberelina	Masculinización
<i>Cucumis sativus</i>	Giberelina	Masculinización
<i>Spinacia oleracea</i>	Giberelina	Masculinización
<i>Solanum carolinense</i>	Giberelina	Masculinización
<i>Asparagus officinalis</i>	Giberelina	Masculinización
<i>Coriandrum sativum</i>	Giberelina	Masculinización
<i>Mercurialis annua</i>	Citocininas	Feminización
<i>Vitis vinífera</i>	Citocininas	Feminización
<i>Spinacia oleracea</i>	Citocininas	Feminización
<i>Asparagus officinalis</i>	Citocininas	Feminización
<i>Solanum carolinense</i>	Citocininas	Feminización
<i>Cucumis sativus</i>	Etileno	Feminización
<i>Cucumis melo</i>	Etileno	Feminización
<i>Citrullus lanatus</i>	Etileno	Masculinización
<i>Solanum carolinense</i>	Ácido abscísico	Feminización
<i>Zea mays</i>	Ácido jasmónico y brasinoesteroides	Masculinización