



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Muerte celular programada en el desarrollo  
del androceo de *Pachycereus pringlei*  
(Cactaceae)**

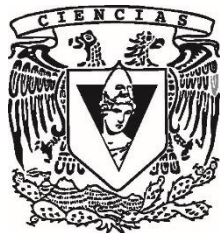
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ALBERTO CARRASCO GÓMEZ



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**1. Datos del alumno**

Carrasco  
Gómez  
Alberto  
04455-2895-4170  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
304007608

**2. Datos del tutor**

Dra.  
Sonia  
Vázquez  
Santana

**3. Datos del sinodal 1.**

Dra.  
Guadalupe Judith  
Márquez  
Guzmán

**4. Datos del sinodal 2.**

Dra.  
Teresa Margarita  
Terrazas  
Salgado

**5. Datos del sinodal 3.**

Dr.  
Ángel Salvador  
Arias  
Montes

**6. Datos del sinodal 4.**

M. en C.  
Mónica Karina  
Pérez  
Pacheco

**7. Datos del trabajo escrito**

Muerte celular programada en el desarrollo del androceo de *Pachycereus pringlei*  
(Cactaceae)  
100 p.  
2016

## **Dedicatoria**

A mi familia, que siempre me ha brindado su cariño y apoyo incondicional.

Alberto, Alejandra, Ana, Luz María y María.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme los espacios necesarios para desarrollar mi vocación profesional.

A la Dr. Sonia Vázquez Santana, por tener la mejor disposición para escuchar mis dudas, compartirme su conocimiento y brindar los elementos para poder desarrollar esta investigación.

A todos los sinodales por las observaciones realizadas a este trabajo, las cuales ayudaron a enriquecerlo.

Al Taller de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias: “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes”, en donde se desarrolló la base del presente trabajo.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco por las asesorías en la realización de las pruebas de acetólisis, así como la interpretación de los resultados.

A la P. de Biol. Fátima Barrón Pacheco y al Dr. Daniel Sánchez Carbajal por su ayuda en la colecta de material en campo.

Al M. en C. Aldebaran Camacho Velázquez por el apoyo brindado en el laboratorio para la elaboración de los cortes histológicos.

A la M. en C. Rocío Hernández Cruz por las asesorías brindadas durante la realización de las pruebas de TUNEL.

Al Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, especialmente a la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín por su apoyo para la captura de fotomicrografías.

Al Laboratorio de Microscopia Confocal de la Facultad de Química, particularmente a la Dra. Karina Jiménez Duran por la captura de fotomicrografías.

Al Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias a cargo de la Dra. Silvia Espinosa Matías, la cual proceso el material y tomó las fotomicrografías del MEB.

A la P. de Biol. Alí Citlalli Segovia Rivas y a la Dra. María Félix Ramos Ordoñez por su apoyo para los análisis estadísticos.

A la Lic. de DCV Ana Karen Aguilera Ramírez por el diseño de esquemas.

Esta tesis fue apoyada con recursos del proyecto CONACYT 101771: *Estudio del polimorfismo sexual en la familia Cactaceae*, otorgado a la directora de Tesis Sonia Vázquez Santana y recursos de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
ANTECEDENTES .....	12
Sistemas sexuales en angiospermas .....	12
Transición de la ginodioecia a la dioecia .....	13
Sistemas trioicos .....	14
Sistemas trioicos en Cactaceae .....	17
Muerte Celular Programada y unisexualidad .....	17
Muerte Celular Programada y la unisexualidad en Cactaceae .....	19
Desarrollo del androceo .....	21
El grano de polen en Cactaceae .....	23
<i>Pachycereus pringlei</i> (S. Watson) Britton & Rose .....	24
Sistemas sexuales de <i>Pachycereus pringlei</i> .....	25
Embriología de <i>Pachycereus pringlei</i> .....	26
HIPÓTESIS .....	28
OBJETIVOS .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
Colecta de material .....	29
Técnicas histológicas .....	31
Acetólisis .....	31
Prueba de TUNEL .....	33
Microscopía electrónica de barrido .....	34
RESULTADOS .....	35
Características generales poblacionales .....	35
Desarrollo del gineceo .....	37
Desarrollo normal del óvulo .....	37

Desarrollo anómalo del óvulo -----	39
Estilo y estigma -----	39
Desarrollo del androceo -----	43
Desarrollo normal -----	43
El grano de polen normal -----	44
Desarrollo anómalo del androceo -----	47
Flores hermafroditas y masculinas -----	47
El grano de polen anómalo masculino y hermafrodita -----	48
Flores femeninas -----	52
El grano de polen del morfo femenino -----	53
Prueba de TUNEL -----	56
Androceo de las flores hermafroditas -----	56
Androceo de las flores masculinas -----	57
Androceo de las flores femeninas -----	57
DISCUSIÓN -----	72
Conformación poblacional -----	72
Gineceo -----	73
Androceo -----	76
Androceo de flores femeninas -----	79
El grano de polen -----	80
Muerte celular programada en <i>Pachycereus pringlei</i> -----	81
Los sistemas sexuales de <i>Pachycereus pringlei</i> -----	82
<i>Pachycereus pringlei</i> : ¿Ruta ginodioecia→ subdioecia→dioecia? -----	84
CONCLUSIONES -----	88
LITERATURA CONSULTADA -----	89

## RESUMEN

El sistema reproductivo trioico se caracteriza por la presencia de individuos masculinos, femeninos y hermafroditas en una población. *Pachycereus pringlei* es una cactácea columnar que se distribuye en el desierto de Sonora y que presenta poblaciones con sistemas hermafroditas, ginodioicos y trioicos. El objetivo de la investigación fue establecer de qué manera la MCP participa en el desarrollo del androceo de los distintos morfos de esta especie. Se colectaron flores y botones en dos localidades de la península de Baja California (Cataviña y Guerrero Negro) las cuales se procesaron utilizando diversas técnicas histológicas, microscópicas y prueba de TUNEL. Las plantas hermafroditas y masculinas produjeron granos de polen esféricos, tricolpados, así como granos de polen con formas irregulares pero con ornamentación normal de la exina. La antera es dehiscente por un proceso de MCP en la zona del estomio. El tapete entra a un proceso de MCP durante la fase de microsporas libres con una primexina. En algunos granos de polen de hermafroditas anormales se detectó MCP. En las plantas femeninas el tapete degenera hasta la etapa de granos de polen joven, y se forman granos de polen con exina sumamente gruesa, los cuales generalmente pierden el citoplasma. De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que las poblaciones estudiadas de *Pachycereus pringlei* presentan sistemas sexuales ginodioicos y subdioicos.



## INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae conforma un grupo monofilético de angiospermas. Ésta ha sido subdividida en cuatro subfamilias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae, siendo esta última la más diversa (Nyffeler y Egli, 2010). La distribución natural de las cactáceas se da a lo largo de todo el continente americano desde Canadá hasta la Patagonia, en un rango de altitudes que van desde el nivel del mar hasta 4500 m.s.n.m. (Anderson, 2001). Por lo general se les encuentra en regiones áridas, con escasa precipitación; sin embargo, algunas especies pueden crecer en regiones con alta precipitación desarrollándose de manera epífita como en bosques tropicales (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999).

El número de especies que conforman la familia Cactaceae varía según los criterios de clasificación. Hunt *et al.* (2006) reconocen aproximadamente 1440 especies, mientras que otros señalan unas 1900 especies (Anderson, 2001; Nyffeler y Egli, 2010). Las tres regiones que concentran la mayor diversidad de especies de cactáceas en orden jerárquico son: México, el sureste de los Andes y el este de Brasil (Hernández-Hernández *et al.*, 2011). En México actualmente se reconoce la presencia de 689 especies agrupadas en 68 géneros (Guzmán *et al.*, 2007).

Las cactáceas desarrollan tallos suculentos y fotosintéticos, que almacenan agua en el parénquima acuífero tanto en el córtex como en la médula. Este almacenamiento de agua también puede darse en algunos tipos de raíces. La gran mayoría de las cactáceas presentan una reducción considerable de las hojas y en su lugar desarrollan espinas, aunque algunos géneros también desarrollan hojas fotosintéticas como en las subfamilias Pereskioideae, Maihuenioideae y algunos géneros de Opuntioideae. La sinapomorfía de la familia es la

presencia de aréolas, las cuales son braquiblastos cubiertos por un indumento de tricomas multicelulares (Bravo-Hollis, 1978; Anderson 2001; Arias y Flores 2013).

Las flores de las cactáceas se producen a partir de un aréola y por lo general son hermafroditas, solitarias, sésiles y con simetría radial. El pericarpelo encierra al ovario y forma el tubo floral, el cual externamente puede formar podarios, espinas, tricomas y/o escamas. El perianto está formado por tépalos, los cuales se diferencian en externos e internos, que generalmente son diferentes en color y la forma del margen. En la pared interna del tubo floral se insertan los estambres, cuyas anteras son bilobulares, tetrasporangiadas y con dehiscencia longitudinal. Usualmente en la base interna del tubo floral se localiza el nectario. El gineceo por lo general es ínfero, multicarpelar y unilocular, desarrollando un solo estilo con diversos lóbulos estigmáticos (Anderson 2001; Arias y Flores 2013).

Los sistemas sexuales en plantas hacen referencia a la manera en la cual el androceo y el gineceo se desarrollan morfológica y funcionalmente, así como en el tiempo y espacio entre los individuos de una población (Orozco y Vázquez, 2013). Se piensa que aproximadamente el 90% de las angiospermas presentan un sistema sexual hermafrodita, y el 10% restante posee un sistema sexual diferente, siendo relativamente comunes los sistemas monoicos, dioicos y ginodioicos. Los sistemas sexuales más inusuales son los androdioicos y trioicos (Ainsworth, 2000).

La muerte celular programada (MCP) se puede definir como una secuencia de eventos potencialmente interrumpibles que llevan a la destrucción controlada y organizada de células o tejidos (Lockshin y Zakeri, 2004). Ésta se relaciona directamente con diversos procesos durante el desarrollo de las plantas, como la diferenciación celular y tisular, la germinación, la abscisión de órganos o como respuesta al ataque de patógenos (Greenberg, 1996; Kuriyama

y Fukuda, 2002; Shishkova y Dubrovsky, 2005; Gadjev *et al.*, 2008) y juega un papel crucial en el desarrollo de las estructuras reproductoras tanto del gineceo como del androceo, así como en el éxito reproductivo (Rogers, 2006).

En la antera se forma el tapete, el cual es un tejido secretor que debe entrar en un proceso de MCP en tiempos claves para que se desarrollen granos de polen viables (Varnier *et al.*, 2005; Parish y Li, 2009). Para su liberación de la antera también es necesario que el estomio entre en un proceso de MCP con la finalidad de provocar la dehiscencia de las mismas (Wu y Cheung, 2000; Rogers, 2006).

Algunas alteraciones en la manera en la cual se ejecuta la MCP puede llevar a una esterilidad en la función masculina. Se ha demostrado que algunas cactáceas desarrollan flores unisexuales y en ellas la MCP se relaciona directamente con la adquisición de la infertilidad en alguno de los órganos sexuales (Alfaro, 2008; Hernández 2011; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012; Flores-Rentería *et al.*, 2013).

*Pachycereus pringlei* es una cactácea columnar autotetraploide que crece en el desierto de Sonora y que tiene reportados sistemas sexuales hermafroditas, trioicos y ginodioicos (Fleming *et al.*, 1994, 1998; Murawski *et al.*, 1994; Medel, 2008), de los cuales se conocen algunos aspectos embriológicos (Núñez, 2004) y se han realizado algunas investigaciones genéticas (Murawski *et al.*, 1994; Medel 2008; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2014) con la intención de entender la variabilidad de su sistema sexual. Sin embargo, en esta especie la descripción detallada del desarrollo y la morfología del androceo es escasa en cada uno de los morfos florales, y se aborda de manera tangencial. Aún hay diversas interrogantes respecto al desarrollo de esta especie: ¿Existen diferencias entre los granos de polen de los distintos morfos florales? De existir diferencias ¿la caracterización de los sistemas sexuales

tendría que replantearse? ¿El estudio del desarrollo de los granos de polen puede aportar elementos que permitan comprender mejor ciertas transiciones evolutivas? ¿La condición unisexual se relaciona directamente con el proceso de MCP en algunas células de la antera o de los granos de polen? Éstas son algunas de las preguntas que el presente estudio trata de responder.

## **ANTECEDENTES**

### **Sistemas sexuales en angiospermas**

Los sistemas de reproducción sexual hacen referencia a la forma en la cual los órganos sexuales se distribuyen en el tiempo y el espacio en una población, así como a las características morfológicas de la flor. Estos sistemas son sumamente dinámicos y pueden modificarse. Se pueden dividir en dos categorías: monomórficos y polimórficos (Barrett, 2002) (Fig. 1).

Los sistemas sexuales monomórficos son los más comunes en la naturaleza, y se caracterizan porque todos los individuos de una población presentan los mismos tipos de flores. Éstas pueden ser exclusivamente hermafroditas, o bien tratarse de individuos con los dos sexos en diferentes flores (es decir monoicos), o formar flores unisexuales y hermafroditas en la misma planta (ginomonoico, andromonoico y trimonoico). En estos sistemas, los tipos florales de una población son constantes (Orozco y Vázquez, 2013).

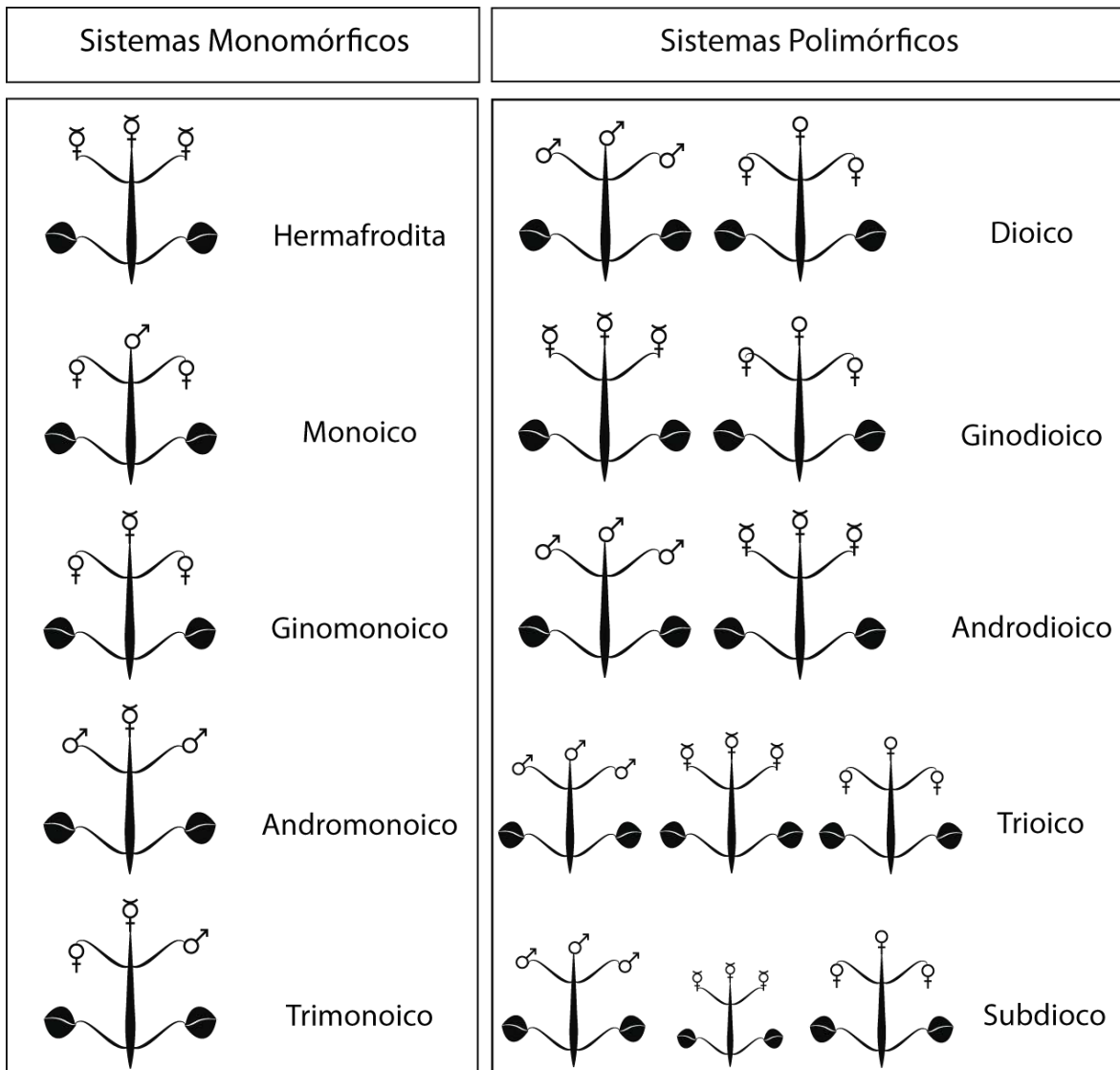
Por otra parte, los sistemas polimórficos se presentan en poblaciones con individuos de al menos dos sexos diferentes. Es decir, que en una población puede haber individuos femeninos y masculinos (dioicismo), femeninos y hermafroditas, (ginodioicismo), masculinos y hermafroditas (androdioicismo), hermafroditas, femeninos y masculinos (trioicismo o subdioecia) (Fig. 1), o bien ser polígamos (sin un patrón en cuanto a la presencia de cualquier tipo floral en los organismos de una población). De estos sistemas polimórficos, el sistema dioico y el ginodioico son los más frecuentes en la naturaleza y en consecuencia la gran mayoría de las investigaciones evolutivas analizan alguno de estos sistemas (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993; Ainsworth, 2000; Barrett, 2002; Charlesworth, 2006; Cuevas y Abarca, 2006; Renner, 2014), postulando diversas teorías o “rutas evolutivas” a través de las cuales se

ha llegado de la condición monomórfica a la polimórfica. Es escasa la literatura que aborda otros sistemas polimórficos. La trioecia ha sido caracterizada como un estado transicional desde la ginodioecia hacia la dioecia (Spigler y Ashman, 2012).

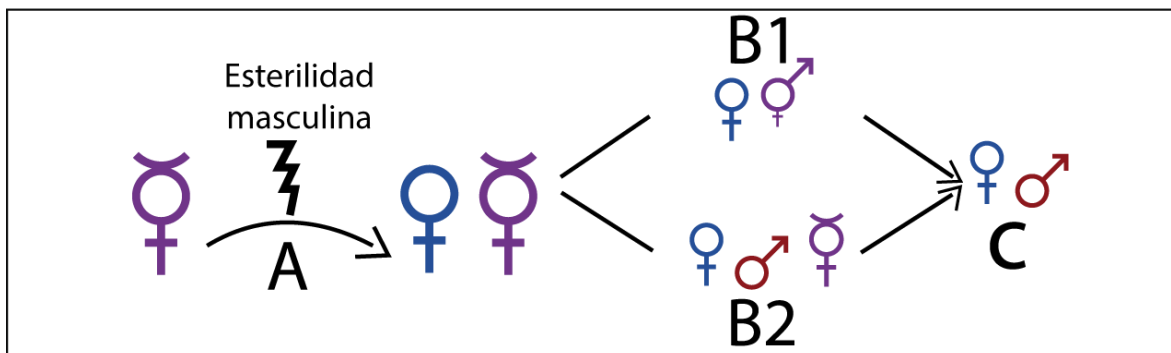
### **Transición de la ginodioecia a la dioecia**

En este modelo se plantea que en una población hermafrodita se adquiere una condición de esterilidad para la función masculina en algunos individuos (Fig. 2A). Esta esterilidad generalmente se describe como citoplasmática, nuclear o nuclear-citoplasmática. Esta última generalmente se encuentra asociada con la ginodioecia (Cuevas y Abarca, 2006). Estas mutaciones se fijan en los individuos de una población si resultan favorables para permitir un aumento de la producción de semillas de los individuos femeninos sobre los hermafroditas, lo cual ha sido demostrado en diversas especies ginodioicas (Spigler y Ashman, 2012). El aumento en la adecuación femenina se ha intentado explicar mediante la hipótesis de la compensación (no se destinan recursos a la función masculina y en consecuencia hay más recursos para la producción de semillas) o bien, mediante la hipótesis de depresión por endogamia (la cual establece que las hembras pueden aumentar su productividad si la progenie de los hermafroditas se ve afectada por una alta tasa de autofecundación y de depresión endogámica) (Cuevas y Abarca, 2006).

Con el aumento de individuos femeninos en la población, el sistema sexual pasa de uno hermafrodita a uno ginodioico. Se han propuesto dos posibilidades acerca de cómo llegar a la condición dioica a partir de la ginodioecia. Puede ser que los individuos hermafroditas vayan perdiendo eventualmente la funcionalidad del gineceo debido a que destinan menos recursos para la función femenina y simultáneamente destinen más recursos y aumenten la adecuación de la función masculina, llegando eventualmente a un estado dioico (Fig. 2B1). O bien, que



**Fig. 1.** Sistemas sexuales en plantas. Retomado y modificado de Ainsworth (2000).



**Fig. 2.** Ruta evolutiva de la transición desde la ginodioecia a la dioecia a partir de un ancestro hermafrodita Retomado y modificado de Spigler y Ashman (2012).

algunos individuos hermafroditas adquieran una mutación heredable, que desencadene en una esterilidad femenina, ocasionando que se puedan identificar tres tipos de individuos en la población: femeninos, hermafroditas y masculinos, como un sistema trioico o subdioico temporal (Fig. 2B2). Los individuos masculinos deben tener una ventaja en la producción de polen para que eventualmente desaparezca el morfo hermafrodita y se convierta en una población dioica (Fig. 2C).

Dentro de esta ruta evolutiva, existen diversos trabajos que demuestran la transición del sistema hermafrodita al ginodioico; sin embargo, existe poca evidencia de la transición del ginodioico al dioico (Spigler y Ashman, 2012), por lo que el estudio de sistemas trioicos o subdioicos puede aportar información que permita comprender mejor cómo es que se llevan a cabo estas transiciones.

### **Sistemas trioicos**

Los sistemas trioicos son difíciles de reconocer y además se encuentran escasamente representados en la naturaleza. La trioecia se define como aquel sistema cuya población se conforma de individuos femeninos, masculinos y hermafroditas con frecuencias relativamente altas y balanceadas (Fleming *et al.*, 1998). Puede existir confusión entre el sistema trioico y el subdioico, ya que ambos se componen de poblaciones con individuos femeninos, masculinos y hermafroditas, pero en el subdioico la mayoría de las veces los individuos hermafroditas se presentan en menor cantidad, o bien, su funcionalidad reproductiva se ve disminuida (Ehlers y Bataillon, 2007). Ross (1982) define al sistema subdioico como aquel en el cual se presentan individuos con flores unisexuales (masculinas o femeninas) e individuos que no se puede identificar de manera clara su sexualidad. El término subdioico puede tener una connotación de un sistema inestable, tendiente al dioicismo (Spigler y Ashman, 2012).



*Coccoloba cereifera* (Polygonaceae) es una especie arbustiva endémica de Brasil, la cual ha sido reportada como trioica. En esta especie se han descrito cuatro morfos florales, uno con flores estaminadas, las cuales forman granos de polen y desarrollan pistilos con estigmas reducidos. Las flores pistiladas presentan anteras indehiscentes que no generan granos de polen y estigmas que sobresalen de las anteras. Hay dos tipos de flores hermafroditas; el primero asemeja más a las flores pistiladas (“hermafrodita femenina”), debido a que produce menor cantidad y calidad de los granos de polen por flor; el otro tipo son las flores estaminadas porque producen una mayor cantidad y calidad de granos de polen que la “hermafrodita femenina” y el estigma se encuentra por debajo del nivel de las anteras (Silva *et al.*, 2008).

*Mercurialis annua* (Euphorbiaceae) ha sido descrita con diferentes sistemas sexuales en distintas poblaciones. Algunas se reportan como dioicas, pero también existen androdioicas, monoicas y recientemente un grupo de investigadores reporta poblaciones trioicas (Perry *et al.*, 2012). *Mercurialis annua* es una herbácea anual polinizada por el viento. Su distribución es amplia, por casi todo el centro y oeste de Europa, así como en la región del Mediterráneo. En este trabajo los autores proponen un modelo para medir la estabilidad del sistema reproductor y de acuerdo al modelo este sistema nunca puede ser estable.

*Fraxinus excelsior* (Oleaceae) es una especie arbórea que ha sido descrita como trioica (Albert *et al.*, 2013), sin embargo este sistema no se podría clasificar estrictamente como trioico, ya que existen individuos que son masculinos, andromonoicos, ginomonoicos, hermafroditas o femeninos. Este tipo de sistema es mejor descrito como polígamo.

## **Sistemas trioicos en Cactaceae**

De la familia Cactaceae menos del 5% de las especies tiene documentado algún aspecto de su biología reproductiva (Mandujano *et al.*, 2010). De cualquier manera se considera que la gran mayoría de las cactáceas forman poblaciones hermafroditas; sin embargo a la fecha 26 especies se han descrito con flores unisexuales, formando poblaciones dioicas, ginodioicas, androdioicas y trioicas (Orozco-Arroyo *et al.*, 2012), aunque la androdioecia anteriormente reportada para *Neobuxbaumia mezcalanesis* (Valiente-Banuet *et al.*, 1997) queda descartada (Gómez, 2010; Ortega, 2016).

*Opuntia robusta* es un cactácea que se distribuye en el centro del país, algunas de sus poblaciones presentan un sistema trioico, mientras que otras se reportan como dioicas, hermafroditas (Del Castillo y Trujillo-Argueta, 2009) o ginodioicas (Janczur *et al.*, 2014). Las flores femeninas presentan anteras atrofiadas sin polen, ovarios con óvulos y estilos cortos con lóbulos estigmáticos, las flores masculinas presentan anteras con mucho polen y cavidad de ovario con óvulos atrofiados y estilos largos. Las flores hermafroditas presentan anteras con polen, ovarios con óvulos y estilos con una longitud intermedia entre los otros dos morfos florales (Del Castillo y González-Espinoza, 1988).

Otra especie descrita con poblaciones trioicas además de ginodioicas y hermafroditas es *Pachycereus pringlei* (Fleming *et al.*, 1998; Medel 2008).

## **Muerte Celular Programada y unisexualidad**

La MCP en plantas provoca la destrucción controlada y organizada de células o tejidos que deben desaparecer después de una función específica. Su regulación se da a nivel genético y comparte características morfológicas y bioquímicas similares a la apoptosis de las células

animales, incluyendo la retracción del citoplasma, así como la condensación y fragmentación de la cromatina (Gadjev *et al.*, 2008).

La MCP en plantas se puede dividir en tres tipos: apoptótica, autofágica y no lisosómica (Doorn y Woltering, 2005). De acuerdo a estos autores la gran mayoría de los eventos de MCP involucrados en el desarrollo de las plantas son del tipo autofágico, sin embargo otros autores argumentan que la diferencia entre el tipo apoptótico y autofágico es la rapidez con la cual se desarrolla el proceso, siendo la apoptosis un proceso rápido y la autofagia lento. Otras características de la autofagia son la liberación de hidrolasas de la vacuola hacia el citoplasma, acompañada de la posterior lisis del tonoplasto y la degradación del contenido celular (Parish y Li, 2009).

Históricamente se han reconocido dos tipos morfológicos de flores unisexuales. Las que se designan como tipo 1 son flores unisexuales por aborción, en las cuales se desarrollan los dos verticilos sexuales, pero por alguna malformación sólo uno es funcional y presentan reminiscencias del otro verticilo. Las flores tipo 2 son unisexuales por supresión y se puede distinguir porque este tipo de flores no desarrolla alguno de los sexos, indicando que el meristemo floral inicia solamente el desarrollo de un verticilo sexual (Mitchell y Diggle, 2005). Diggle *et al.* (2011) reportan 292 taxones con flores unisexuales, de las cuales sólo en 21 se ha descrito como se adquiere esa condición unisexual durante el desarrollo.

En varias especies de angiospermas con flores unisexuales tipo 1 se han relacionado de manera directa alteraciones en el proceso de MCP para abortar uno de los órganos sexuales (Coimbra *et al.*, 2004; Strittmatter *et al.*, 2006; Hernández, 2011; Flores-Rentería *et al.*, 2013). *Actinidia deliciosa* (Actinidiaceae) es una especie dioica, en ella las flores femeninas desarrollan anteras similares a las masculinas hasta la fase de tétradas. Al liberarse las

microsporas, éstas desarrollan una pared con exina pero sin intina. Cuando las microsporas degeneran se lleva a cabo la degradación de sus núcleos (Coimbra *et al.*, 2004).

Por su parte *Zea mays* (Poaceae) es una especie monoica que se caracteriza porque en un principio del desarrollo todas las flores son hermafroditas, pero debido a diversos procesos (genéticos y hormonales) algunas espigas se desarrollan como masculinas y otras (el xilote) como femeninas (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1994). Anteriormente se pensaba que la diferenciación sexual se daba en algunas células subepidérmicas del pistilo, que entraban a un proceso de MCP (Calderon-Urrea y Dellaporta, 1999), sin embargo mediante la prueba de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) se demostró que no existe fragmentación de ADN y que la aborción del verticilo se debe a un arresto en el ciclo celular ocasionado por la ausencia de Ciclina B y la acumulación de un regulador negativo del ciclo celular (Kim *et al.*, 2007).

### **Muerte Celular Programada y la unisexualidad en Cactaceae**

En la familia Cactaceae existen diversos reportes que relacionan de manera directa la MCP con el desarrollo de flores unisexuales, por ejemplo en los géneros *Consolea* (Strittmatter *et al.*, 2006), *Opuntia* (Alfaro, 2008; Hernández, 2008; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012; Flores-Rentería *et al.*, 2013) y en *Echinocereus* (Hernández, 2011).

En la subfamilia Opuntioideae, se identificaron diferencias en la MCP del tapete de anteras de flores femeninas y masculinas de *Consolea spinosissima*, *C. millspaughii*, *C. rubescens*, *C. moniliformis*, *C. nashii*, y *C. picardeae*. Todas estas especies se describen con un sistema sexual subdioico/ dioico críptico (Strittmatter *et al.*, 2008). Las anteras de las flores femeninas presentan un desarrollo anómalo con respecto a las anteras de las flores masculinas en etapa de célula madre de la microspora. El tapete crece en sentido radial, conserva la pared celular

e invade de tal manera el lóculo que las células madre degeneran. En algunas de estas especies el desarrollo de la capa media es persistente y las anteras son indehiscentes. Estudios de la ultraestructura del tapete, hacen suponer a los autores que algunas alteraciones durante el proceso de MCP en las anteras de las flores femeninas son las responsables de la unisexualidad (Strittmatter *et al.*, 2006). El desarrollo del gineceo en todas estas especies fue como el típico de la subfamilia Opuntioideae, sin embargo presentaron heterocronía (la cual se define como el cambio en el ritmo de los procesos ontogenéticos) en el desarrollo del gineceo. En la antesis el ovario de las flores femeninas tienen óvulos funcionales, mientras que las flores masculinas presentan óvulos senescentes e incapaces de ser fecundados (Strittmatter *et al.*, 2008).

En una población dioica de *Opuntia robusta* se estudió la disfuncionalidad del androceo en las flores femeninas. Las flores pistiladas se caracterizaron porque las células madres de las microsporas se rodean de manera irregular de calosa y algunas llevan a cabo la meiosis (Silva, 2007). En etapa de tétradas de las microsporas (previo a su liberación) es cuando acontece su degradación ya que se ha registrado fragmentación del ADN en todos los estratos de la pared de la antera (Alfaro, 2008). En las flores masculinas se han observado evidencias de MCP en ovario y óvulos (Hernández, 2008).

*Opuntia stenopetala* es una cactácea dioica y la MCP juega un papel importante en la pérdida de la funcionalidad masculina en flores pistiladas. En éstas la degradación del tapete se da en una etapa del desarrollo anterior al momento en que lo hace el tapete de los individuos masculinos. En etapas posteriores, cuando las células madres de las microsporas lucen colapsadas, todos los estratos de la antera presentan signos de MCP (Flores-Rentería

*et al.*, 2013). Por su parte la disfuncionalidad del gineceo en flores estaminadas no se relaciona con un proceso alterado de MCP (Orozco, 2012; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012).

En la subfamilia Cactoideae se tienen reportes de que *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* presentan un sistema sexual dioico. En ambas especies, el morfo femenino presentó un proceso de MCP en las células madres de las microsporas, así como en el tapete. La degradación del tapete se da en ambos sexos, sin embargo, el proceso ocurre en una fase más temprana en los individuos femeninos, lo que conlleva a la degradación temprana del androceo (Hernández, 2011).

### **Desarrollo del androceo**

La formación de los estambres (que en su conjunto forman el androceo) se da a partir del meristemo floral. En una fase temprana se lleva a cabo la diferenciación de lo que será la base del filamento y posterior a varias divisiones periclinales, se desarrolla la región que va a dar origen a la antera (Márquez, 2013).

Los primordios de antera se encuentran rodeados por una protodermis que cubre al tejido arquesporral. El tejido arquesporral se divide periclinalmente, formando dos nuevos estratos: la capa parietal primaria (la más cercana a la protodermis) y el tejido esporógeno. El tejido esporógeno se divide mitóticamente y crece para dar origen a las células madres de la microspora. La capa parietal primaria, se vuelve a dividir periclinalmente y se forman la capa parietal secundaria interna y externa. De acuerdo a Davis (1966) en las cactáceas el desarrollo de la pared de antera es de tipo monocotiledóneo, ya que la capa parietal secundaria externa se diferenciará en el endotecio y la capa parietal secundaria interna se divide periclinalmente para formar la capa media y el tapete. La pared de una antera se

compone de cuatro capas, que de afuera hacia adentro son: epidermis, endotecio, capa media y el tapete (Márquez, 2013).

Al adquirir cierto tamaño, las células madres de la microsporas se rodean de calosa, e inician el proceso de meiosis, lo cual da como resultado una tétrada de diversas formas. En la tétrada se inician la formación de la pared del grano de polen, con la formación de la primexina, la cual es una pared formada principalmente de celulosa, en donde se ensamblan las probáculas. La calosa que rodea a las tétradas se degrada por acción de la calasa, la cual es una enzima liberada por el tapete (Heslop-Harrison, 1968). Las microsporas libres aumentan de tamaño, al mismo tiempo que una gran vacuola se desarrolla al centro, la cual desplaza al núcleo a la periferia, en donde se divide de manera asimétrica, dando por resultado una célula de gran tamaño y con abundantes organelos denominada célula vegetativa (la cual formará el tubo polínico) y la pequeña es la célula generatriz. Esta última se dividirá mitóticamente para dar origen a las células espermáticas, las cuales viajan a través del tubo polínico, una fecunda a la ovocélula y la otra se une a los núcleos polares formando el endospermo (Márquez, 2013).

Poco después de la liberación de las microsporas de las tétradas, en el tapete se inicia un proceso de MCP, el cual es indispensable para la correcta formación del grano de polen. La desintegración de la pared celular y de la membrana plasmática de las células tapetales es esencial para que los productos formados por éstas puedan ser depositados en el grano de polen (Parish y Li, 2009).

El tapete en cactáceas es de tipo secretor, el cual se caracteriza por la liberación de cuerpos de Ubisch, los cuales son estructuras esferoidales de una composición compleja, de las cuales se ha especulado que están formados de esporopolenia y de proteínas esenciales para

el desarrollo del grano de polen (Parish y Li, 2009). El tapete también es el encargado de la producción del *pollenkit*, una capa hidrofóbica compuesta principalmente por lípidos y carotenoides, así como la trifina, la cual es una mezcla de sustancias hidrofóbicas e hidrofílicas (Márquez, 2013).

El avance tecnológico de la microscopía ha permitido desde la segunda mitad del siglo veinte conocer nuevos aspectos de la estructura de la pared del grano de polen, tanto de su ontogenia como de su estructura (Erdtman, 1966, 1969; Heslop-Harrison, 1968), composición y el control que subyace a la formación de una morfología tan compleja (Rogers y Harris, 1969; Jackson *et al.*, 2000; Blackmore *et al.*, 2007).

Mientras el tapete se degrada y se termina de formar la pared de los granos de polen, el endotecio experimenta unos engrosamientos desiguales, los cuales en conjunto con la degradación del estomio (la cual se da por un proceso de MCP) permiten la dehiscencia de la antera y la posterior liberación de los granos de polen maduros (Rogers, 2006).

### **El grano de polen en Cactaceae**

En general el grano de polen en cactáceas se caracteriza por dispersarse en mónadas. Presentan un tamaño de mediano a grande (35-150  $\mu\text{m}$ ), son isopolares, de forma esferoidal a prolada. Pueden presentar desde tres hasta doce colpos. En general, la sexina es más gruesa que la nexina. La exina es columelada y tectada. El tectum generalmente es microperforado, algunas veces reticulado y generalmente equinado (Kurtz, 1963; Erdtman, 1966; Anderson, 2001). Por lo general, en la subfamilia Pereskioideae el grano de polen es pantocolpado (Cuadrado y Garralla, 2009), mientras que en Opuntioideae es poliporado (Anderson, 2001) y tricolpados en Cactoideae (Miesen *et al.*, 2015) y Maihuenioideae (Cuadrado y Garralla, 2009).



Existen pocos trabajos palinológicos de la tribu Pachycereeae, y del género solamente se han reportado características de grano de polen de *Pachycereus weberi* (Aguilar-García *et al.*, 2012) el cual es descrito como isopolar, tricolpado, de forma esferoidal, con exina tectada, microperforada y equinada; presentó una gran variación en el tamaño del grano de polen, así como en el tamaño de las espinas.

### ***Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton & Rose**

Un elemento característico de los desiertos mexicanos son las comunidades formadas por las cactáceas columnares tales como los organales, sahuarales, tetecheras o cardonales (Bravo-Hollis, 1978), entre ellos *P. pringlei*. El género *Pachycereus* es monofilético y actualmente se compone de cinco especies de cactáceas columnares de gran tamaño: *Pachycereus grandis*, *P. pecten-aboriginum*, *P. pringlei*, *P. tepamo* y *P. weberi* (Arias y Terrazas, 2009).

*Pachycereus pringlei* es una cactácea columnar autotetraploide (Murawski *et al.*, 1994) que presenta un tallo candelabriforme, de amplia distribución a lo largo de toda la península de Baja California, así como en gran parte del estado de Sonora (Arias y Terrazas, 2009). Se caracteriza por presentar un tronco bien definido, de aproximadamente 15 metros de alto con un diámetro de máximo un metro. Las ramificaciones son escasas aunque gruesas. Los tallos presentan de 13 a 15 costillas por rama, excepcionalmente hasta 17. Las aréolas son elípticas. Las espinas son variables en número, estructura y longitud (Bravo-Hollis, 1978). La región floral y la vegetativa del tallo pueden distinguirse debido a que la región vegetativa exhibe aréolas con espinas fuertes y con un arreglo evidente entre espinas centrales y radiales. La región reproductiva comprende aproximadamente dos metros a partir del ápice de cada rama y las espinas en esa zona son delgadas, flexibles y deciduas, sin un arreglo evidente entre espinas radiales y centrales. El color del tallo en la región reproductiva es

glauco. La floración inicia a finales de marzo, con el pico de floración a finales de abril, inicios de mayo y extendiéndose hasta julio. La formación de frutos se lleva a cabo desde mayo hasta finales de septiembre (Arias y Terrazas, 2009).

Las flores son de forma campanular, grandes, de 6 a 8 cm de largo, confluentes, generalmente sin espinas, con el tubo receptacular y pericarpelo provisto de escamas pequeñas y agudas de 3 a 5 mm de longitud. Éstas crecen escondidas entre una masa de pelos de color café que se producen en las axilas. Los segmentos interiores del perianto son de color blanco a crema, anchos, extendidos. La antesis es crepuscular o nocturna. Los botones florales son de color verdoso (Bravo-Hollis, 1978).

Las características florales de esta especie se han asociado al síndrome de polinización quiropterófila (Faegri y van der Pijl, 1979), lo cual ha sido reportado para otras cactáceas columnares (Valiente-Banuet *et al.*, 1996). Se ha identificado al murciélago *Leptonycteris curasoae* como el principal polinizador. También es frecuente que esta especie reciba visitas florales de abejas y aves en las primeras horas de la mañana siguiente a la antesis (Fleming *et al.*, 1994, 1996; Medel, 2003).

### **Sistemas sexuales de *Pachycereus pringlei***

En 1994 se describen algunas características ecológicas de una población trioica de *P. pringlei* ubicada en Bahía Kino (Fleming *et al.*, 1994). Los individuos masculinos son caracterizados como productores de polen y presentar las cavidades ováricas con funículos, abortando la gran mayoría de los frutos. Los hermafroditas producen tanto polen como frutos con semillas. Los individuos femeninos producen frutos y no producen polen. Además existen dentro de la población individuos que generan flores neutras sin producción de polen ni frutos (Fleming *et al.*, 1994). En un trabajo posterior este grupo de investigadores realizan un

muestreo a lo largo de toda la península de Baja California y parte del estado de Sonora. Reportan que existe una variación de los sistemas reproductivos que presenta la especie, siendo ginodioicos en algunos sitios y trioicos en otros (Fleming *et al.*, 1998). Una investigación posterior de Medel (2008) indica que en las islas Cerralvo y Santa Catalina el sistema sexual es exclusivamente hermafrodita.

Se ha intentado explicar la variación del sistema sexual bajo la hipótesis de que ésta se encuentra asociada con la distribución geográfica que presenta su principal polinizador, *Leptonycteris curasoae* (Fleming *et al.*, 1998). Dicha hipótesis se ha intentado corroborar en diversos experimentos, sin embargo los resultados obtenidos no son congruentes con los esperados por el modelo que sustenta la hipótesis.

En experimentos germinativos, las plántulas de las semillas hermafroditas fueron más grandes al trascurso de dos años comparadas con las plántulas de plantas femeninas. Además las semillas de flores femeninas germinaban en menor medida (Sosa y Fleming, 1999). Por otra parte, la producción de frutos y semillas es ligeramente mayor en los individuos femeninos que en los hermafroditas tanto en poblaciones ginodioicas como trioicas. Los hermafroditas son autocompatibles y al parecer no hay depresión por endogamia (Cervantes, 2001; Molina-Freaner *et al.*, 2003).

### **Embriología de *Pachycereus pringlei***

Núñez (2004) estudió la embriología de una población trioica de *P. pringlei* ubicada en las cercanías de Bahía Kino, Sonora. Describe a las flores bisexuales con anteras bilobuladas, tetrasporangiadas, con desarrollo de pared de antera de tipo monocotiledóneo. Las células madres de la microspora se rodean de calosa pero se mantienen unidas por puentes citoplasmáticos, los cuales desaparecen al inicio de la meiosis cuando están completamente

rodeadas de calosa. Al dividirse se obtiene una tétrada tetraédrica. La capa media es efímera y el tapete binucleado se empieza a degradar desde que se presentan los granos de polen joven. El grano de polen es tricolpado, con una exina, tectada y espinulada. Al momento de su dispersión los granos de polen son tricolpados.

Las flores femeninas en una etapa temprana las anteras presentan células madres de las microsporas en apariencia normales; sin embargo, la deposición de calosa se da de manera irregular, siendo muy delgada en algunos sitios y formando puentes citoplasmáticos más evidentes que los de las flores bisexuales y masculinas. En algunas ocasiones las paredes de calosa son tan delgadas que la comunicación citoplasmática parece continua. También se señala que el tapete puede llegar a crecer de manera intrusiva en el lóculo y que algunas células con apariencia de microspora se rodean de exina, a pesar de que el tapete todavía es persistente. En etapas posteriores del desarrollo los granos de polen tienen una deposición excesiva de esporopolenina, sin formar una pared continua y en muchos casos el citoplasma sale del grano de polen.

En el gineceo de las flores masculinas Núñez (2004) reporta dos tipos florales masculinos: ambos con ovario, estilo y estigma bien desarrollados. Uno de los tipos tiene ovario, cuyos óvulos son protuberancias nucelares y funículos largos, pero sin tegumentos. El otro morfo masculino presenta desarrollo de óvulos amorfos, con la nucela cubierta parcial o totalmente por los tegumentos. Algunos llegan a desarrollar semillas, las cuales pueden carecer de testa o en caso de presentarla es de morfología anómala y en algunos casos contienen embriones con una curvatura diferente a la de los embriones de los morfos femeninos o hermafroditas. Esta inconsistencia en el desarrollo del gineceo también es reportada por Medel (2003) en una población en El Comitán en Baja California Sur y él describe como “una función

hermafrodita pobremente femenina (HEPF)”, la cual identifica así por la presencia de óvulos con formas similares a las masculinas o por la escasa cantidad de óvulos.

## **HIPÓTESIS**

La muerte celular programada es el proceso mediante el cual se adquiere la esterilidad masculina en *Pachycereus pringlei*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Determinar si la muerte celular programada interviene en el desarrollo del androceo de las flores de *Pachycereus pringlei*.

### **Objetivos particulares**

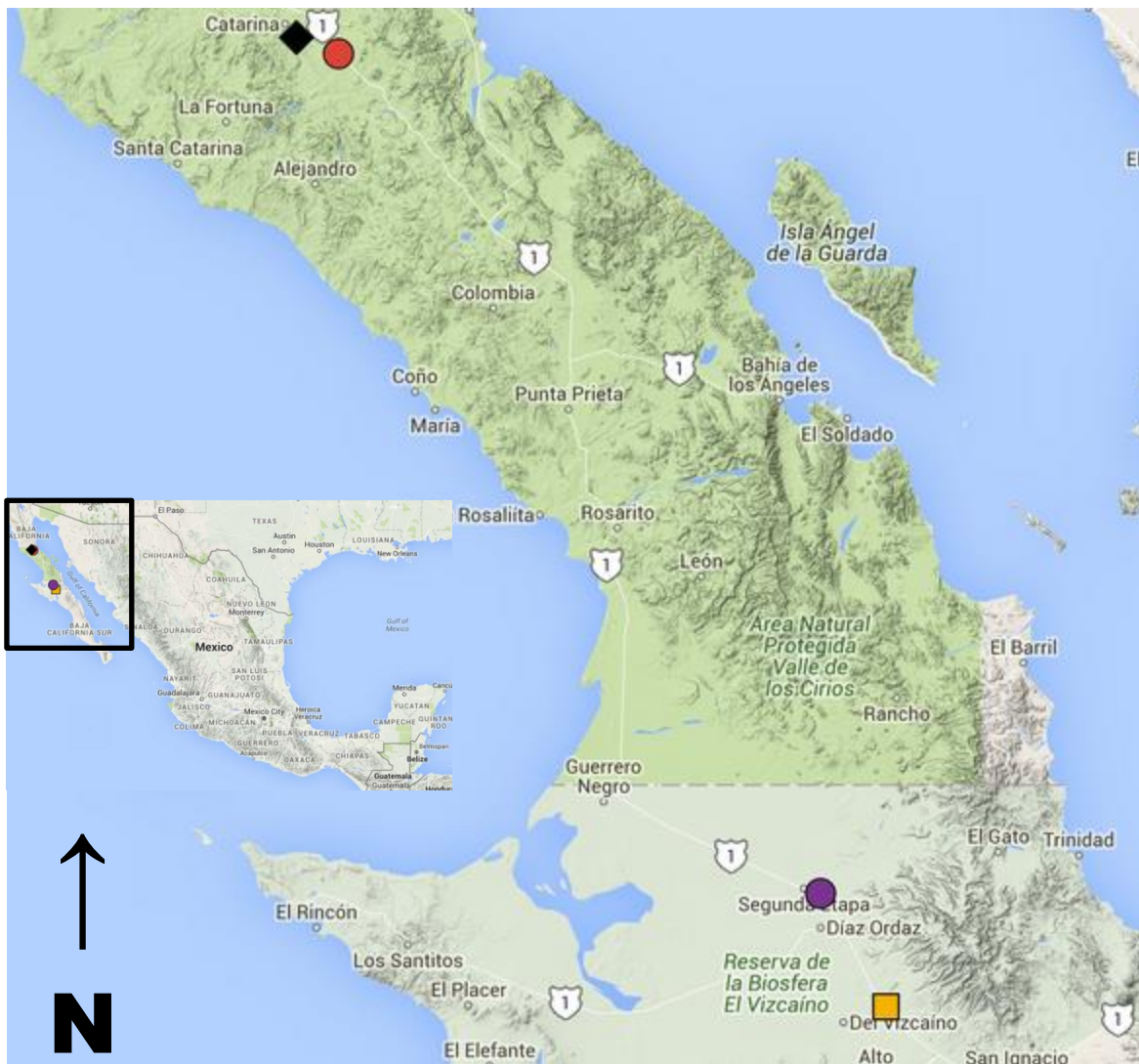
- Caracterizar las anomalías en el desarrollo del androceo en una población ginodioica de Cataviña y una trioica de Guerrero Negro, en la península de Baja California.
- Estudiar la morfología del grano de polen de los morfos florales de *Pachycereus pringlei*.
- Determinar si existe la muerte celular programada en el androceo de los morfos florales de *Pachycereus pringlei* y saber si hay diferencia entre ellos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de material

Se visitaron dos poblaciones de *Pachycereus pringlei* en abril de 2014 para colectar flores y botones florales. La primera localidad donde se colectó se encuentra en el estado de Baja California Sur relativamente cerca a la población de Guerrero Negro. Se ubica cerca de la carretera Santa Rosalia-Paralelo 28, aproximadamente en el Km 155. Las coordenadas del sitio de colecta son 27° 43' 51.5" latitud Norte 113° 26' 50.3" longitud Oeste con una altitud de 81 msnm (Fig. 3, Población 1). La vegetación es matorral crasicaule siendo dominante *Pachycereus pringlei*, así como varias especies de *Cylindropuntia* y *Yucca*. El sitio tenía signos de perturbación por gran cantidad de basura encontrada. La segunda localidad se localiza en el estado de Baja California, en la región de Cataviña. El sitio se ubica en la carretera Lázaro Cárdenas – Punta Prieta en el km 168. Las coordenadas del sitio de estudio son 29° 48' 1.8" latitud Norte y 114° 48' 12.6" longitud Oeste, a una altitud de 655 msnm (Fig. 3, Población 2). La vegetación en este caso también era matorral crasicaule siendo los principales elementos *Pachycereus pringlei* y *Fouquieria columnaris*, acompañados de *Fouquieria splendens*, *Ferocactus cylindraceus* y diversas especies de *Agave*. Este sitio no presentaba signos de perturbación por actividad humana.

En ambos sitios se colectaron los botones y flores en antesis desprendiéndolos del tallo con la ayuda de una garrocha. Los individuos del estudio se seleccionaron a conveniencia, buscando que presentasen flores en antesis, botones en desarrollo y que también fuese posible alcanzar los botones y flores. En la población cercana a Guerrero Negro se colectaron muestras de diez plantas y en la localidad de Cataviña se colectó material de ocho plantas.



**Fig. 3.** Mapa de las poblaciones estudiadas de *Pachycereus pringlei* en la península de Baja California.

**Simbología**

- |                |               |                 |                 |
|----------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Guerrero Negro | Cataviña      | San Francisco   | Cataviña        |
| ● Población 1  | ● Población 2 | ■ (Medel, 2008) | ◆ (Medel, 2008) |

En campo se determinó de manera provisional el sexo de cada planta mediante la observación con lupa considerando la presencia o ausencia de polen en una flor en antesis o en algunos casos postantesis. También se realizó un corte longitudinal de la cavidad ovárica con la finalidad de observar la forma de los óvulos y la cantidad de los mismos. En las flores en antesis se disectaron los tépalos y se retiró parte del pericarpelo y posteriormente el material se fijó en FAA o formaldehído al 4%.

## **Técnicas histológicas**

Los botones florales y las flores en antesis fueron fijados en FAA (Formaldehído 10%, ácido acético glacial 5%, alcohol etílico 96° 50%, agua destilada 35%) (López-Curto *et al.*, 2005) durante 72 horas. Posteriormente se lavó con agua purificada, realizando tres cambios cada 15 minutos y se deshidrató parcialmente mediante una serie gradual de etanoles al 50% y 70%. En esa concentración de etanol al 70% el material se almacenó para su posterior análisis en el laboratorio.

En el laboratorio el material se deshidrató en una serie gradual de etanoles (85% 96% y dos cambios en alcohol absoluto) durante una hora en cada alcohol. Las muestras deshidratadas se pasaron a xilol durante 15 minutos y después en una mezcla xilol:paraplast en proporción 1:1, el cual se dejó a 60 °C durante 24 horas. Pasado este periodo se dejó durante 24 horas en paraplast puro. Se realizaron cortes de 7 a 8  $\mu\text{m}$  de grosor con un micrótopo rotatorio. Los cortes se extendieron y montaron en portaobjetos. Posteriormente y se tiñeron con safranina-verde rápido (López-Curto *et al.*, 2005). Se realizaron fotomicrografías en el laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias con un microscopio Olympus Provis AX70. Algunas muestras se desparafinaron e introdujeron en Slidebride (sustituto de Xilol) y se deshidrataron en una serie gradual de etanoles (100%,100%, 96%, 70%, 50%, 30%) y posteriormente se sellaron con medio de montaje con DAPI. Estos cortes se observaron en un microscopio Olympus BX41.

## **Acetólisis**

La metodología de la acetólisis fue ligeramente modificada a la propuesta por Erdtman (1969). Para llevarla a cabo se utilizó el material fijado en FAA y almacenado en etanol al 70%, del cual se disectaron anteras de flores en antesis de los distintos morfos florales. Las anteras



se colocaron en tubos eppendorf y se les adicionó ácido acético glacial. Se maceraron hasta obtener una consistencia uniforme y el material se dejó reposar a temperatura ambiente durante cinco días. Posteriormente se centrifugaron los tubos y se tiró el sobrenadante. A las pastillas se le adicionó aproximadamente 1 ml de mezcla acetólica (Anhídrido acético-Ácido sulfúrico en proporción 9:1).

Una vez incorporada la mezcla, el material se mantuvo en agitación constante durante diez minutos por muestra, procurando que el tubo se encontrase dentro de un baño María a una temperatura entre los 70 a 80 °C.

Transcurrido el tiempo se detuvo la reacción adicionando ácido acético glacial (aproximadamente 1 ml). El material se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante, se añadió ácido acético, se homogenizó la pastilla con un vortex y se volvió a centrifugar a 2500 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante se desechó y se adicionó nuevamente ácido acético. Posteriormente el material se homogenizó y se centrifugó a 2500 rpm durante cinco minutos con agua destilada. Se repitió el proceso de decantación, homogenización y centrifugación con el agua destilada. Una vez realizada la segunda homogenización el contenido de la mezcla fue tamizado. El tamizado se centrifugó durante siete minutos para obtener el concentrado. Con ayuda de una pipeta Pasteur se obtuvo una gota del concentrado, la cual se montó en un portaobjetos con jalea glicerizada. La preparación se cubrió con cubreobjetos y se selló con barniz de uñas.

Se realizaron observaciones y mediciones de los granos de polen con un fotomicroscopio Leica DM 500 y se procesaron las imágenes con el software Leica LAS EZ. Para determinar si existen diferencias significativas en el grosor de exina de los granos de polen se ocupará una prueba de Kruskal-Wallis.

## **Prueba de TUNEL**

Se realizaron cortes entre cuatro a seis micrómetros de grosor de anteras en distintas etapas de desarrollo y de los tres morfos florales, los cuales se montaron en portaobjetos para inmunolocalización. Los cortes se desparafinaron durante 30 minutos en una estufa a 60 °C. Transcurrido el tiempo las muestras se colocaron en un recipiente con Slide Brite durante 5 minutos y se realizó un cambio a otro recipiente con el mismo reactivo. Posteriormente los cortes se hidrataron en etanol de manera gradual, cambiando cada 5 minutos concentraciones al 100%, 96%, 85% y 70 %. A continuación se efectuaron tres lavados con buffer PBS por 3 minutos cada uno. Se secó el exceso de PBS, absorbiendo con papel filtro. Los cortes se aislaron sobre el portaobjetos con marcador ceroso PAP PEN. A todos los cortes se les agregó proteinasa K (dos gotas) sobre los cortes y se dejó incubar a 30 °C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se lavaron tres veces con buffer PBS, cada lavado fue de minutos.

Después de este paso se separó la muestra, destinada a servir como control positivo. El resto de las preparaciones permanecen con el último lavado de PBS, hasta que termina el procesamiento del control positivo.

Al control positivo se le agregaron 50 µL de la solución con DNAsa I 3000 U/mL de DNasa, en buffer (Para preparar 100 µL: mezclar 15 µL de DNasa I, 10 µL de buffer y 75 µL de agua bidestilada). La muestra se cubre con parafilm durante 25 minutos. Transcurrido el tiempo, se lavó tres veces con PBS, tres minutos en cada uno.

Se seleccionaron los cortes que servirían como controles y se le agregaron 50 µL de la solución de marcaje (sin enzima), la cual corresponde al vial 2 del Kit de TUNEL. Se cubrió la muestra con parafilm y se mantuvo por hora y media en una cámara húmeda, en oscuridad a temperatura ambiente.

Se preparó la mezcla de reacción de TUNEL añadiendo el volumen total (50  $\mu$ L) de enzyme solution (vial 1) al remanente del vial 2 (label solution) para obtener 500  $\mu$ L de la mezcla de reacción de TUNEL.

Se agregaron 50  $\mu$ L de la reacción de TUNEL a cada región tanto del grupo experimental como al control positivo y se cubrieron con parafilm. Se mantuvieron por hora y media en una cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente.

Todas las muestras se lavaron individualmente con PBS, en cuatro ocasiones, dejando transcurrir tres minutos entre cada lavado, manteniendo la condición de oscuridad. Finalmente se adicionó medio de montaje para fluorescencia con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se colocó un cubreobjetos. Las muestras se sellaron con barniz de uñas transparente y las preparaciones se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su observación. Las observaciones se realizaron en un microscopio confocal Olympus FV1000.

### **Microscopía electrónica de barrido**

Algunas anteras de los distintos morfos florales que se tenían almacenadas en alcohol al 70% se deshidrataron en una serie gradual de etanoles (85%, 96%, 100%, 100%) durante una hora cada muestra. Posteriormente se llevó a punto crítico de deshidratación con CO<sub>2</sub>, para posteriormente montar en portamuestras y ser cubiertos con una capa fina de oro. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV y se tomaron fotomicrografías.

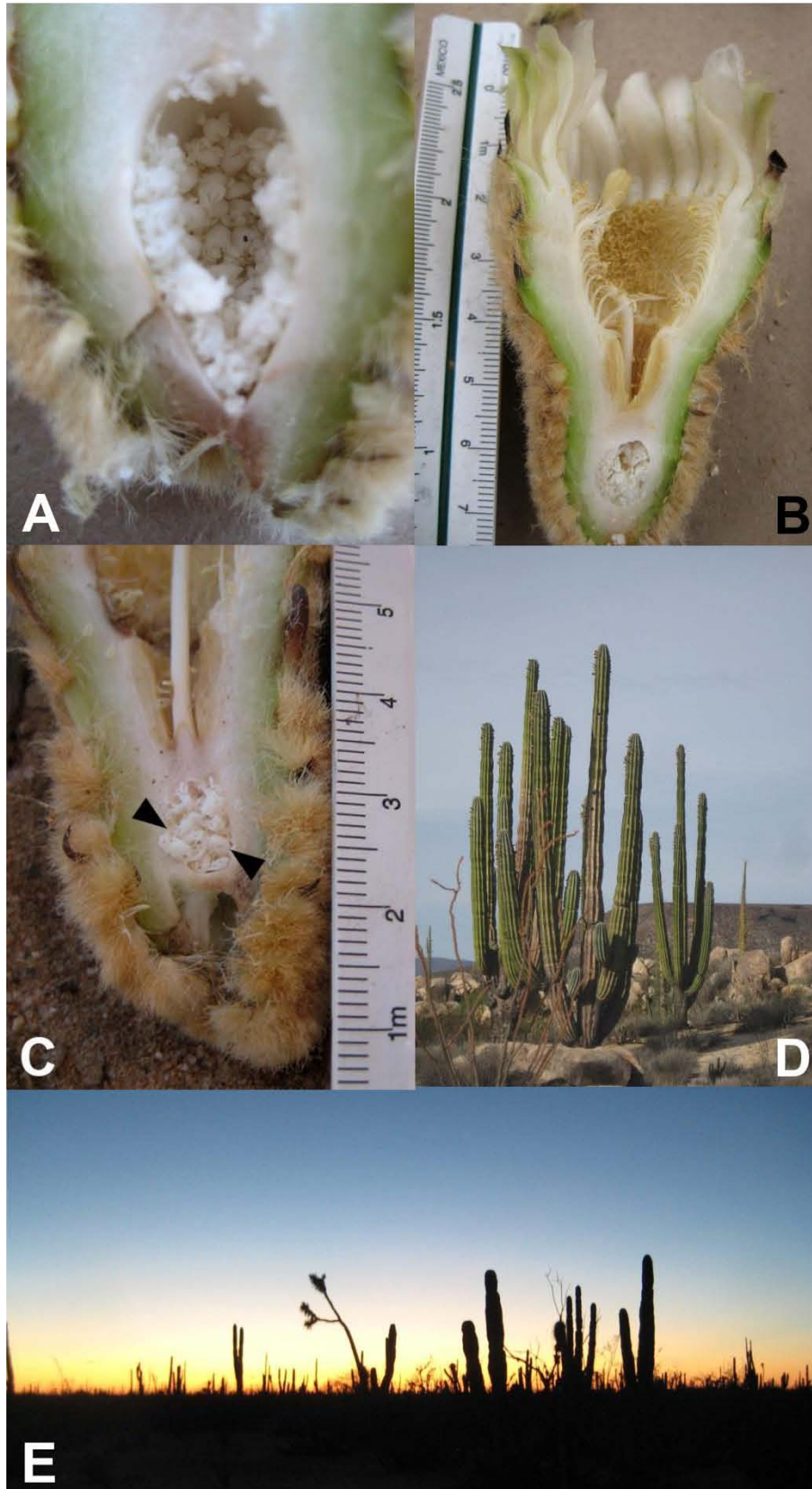
## RESULTADOS

### Características generales poblacionales

Las observaciones en campo permitieron identificar la sexualidad de los individuos al realizar un corte longitudinal de las flores en antesis. En los individuos femeninos y hermafroditas (Fig. 4A, B) se distingue una cavidad ovárica grande, con abundantes óvulos mientras que en los individuos masculinos se presenta una cavidad ovárica reducida y con pocos óvulos con curvaturas diferentes a las hermafroditas o funículos alargados y delgados de apariencia notoriamente diferente (Fig. 4C).

La producción de polen pudo evaluarse de manera certera después del trabajo en el laboratorio, puesto que las colectas se realizaron por las mañanas, lo que ocasionaba que algunas flores tuviesen visitantes florales nocturnos y diurnos y algunas plantas fueron consideradas inicialmente hermafroditas (por la presencia de polen que dejaban los visitantes florales), y posteriormente fueron determinadas como funcionalmente femeninas por las características que se observaban en el desarrollo de las anteras.

El muestreo en la población cercana a Cataviña (Fig. 4D) consistió de cinco individuos que eran del sexo femenino y tres hermafroditas. La población de Guerrero Negro (Fig. 4E) se compuso de un individuo hermafrodita, tres masculinos y seis femeninos. Se analizaron aproximadamente siete flores de cada individuo, para describir el desarrollo de cada planta. La expresión sexual de cada planta fue constante en todas las plantas estudiadas, y las características del desarrollo fueron similares entre las dos poblaciones, sin embargo, existieron particularidades que son descritas a continuación.



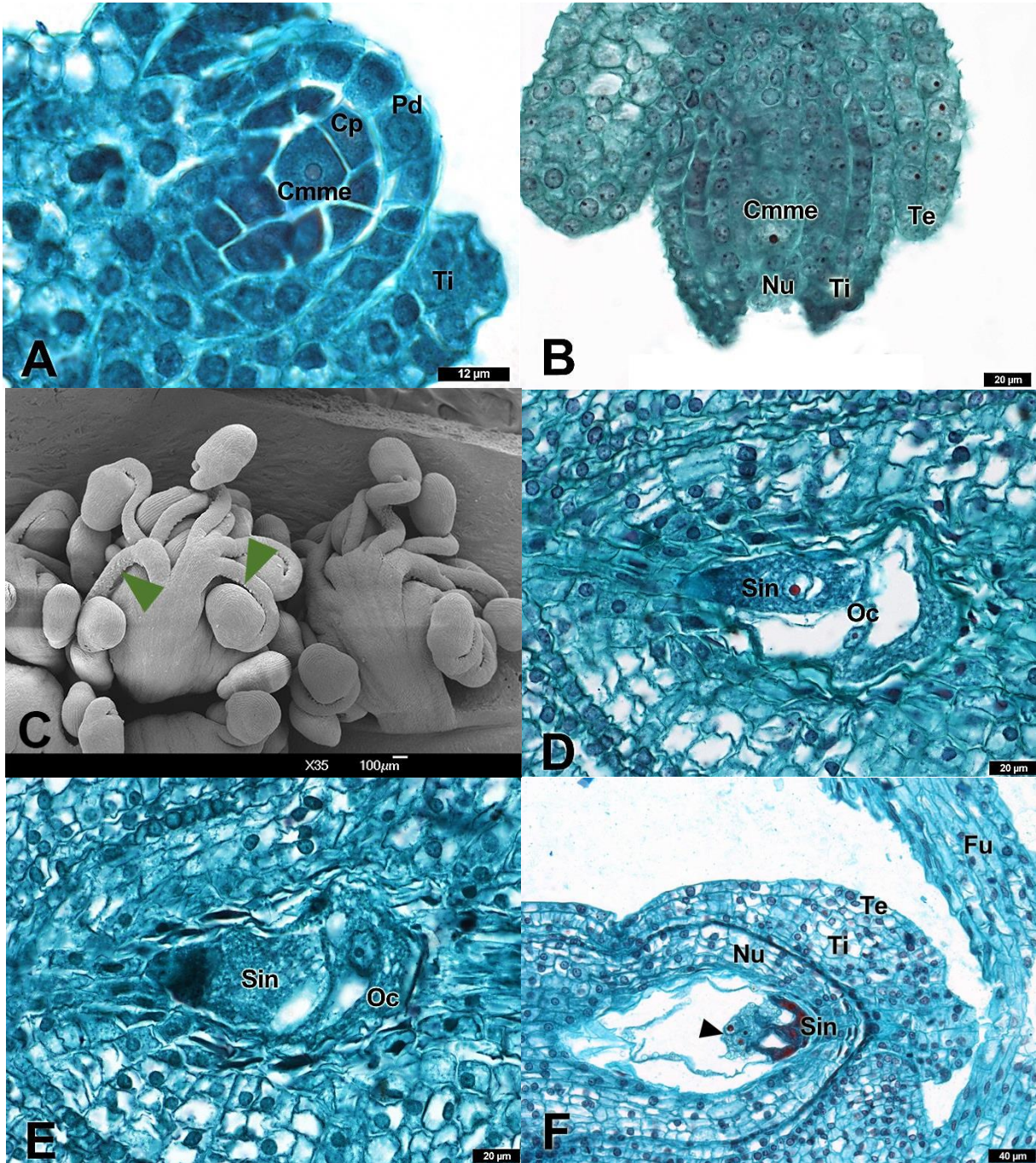
**Fig. 4. Observaciones de campo de *Pachycereus pringlei*.** **A.** Acercamiento al lóculo del ovario de una flor femenina. Nótese la forma de los óvulos (Guerrero Negro). **B.** Corte longitudinal de flor hermafrodita (Cataviña) **C.** Acercamiento al lóculo del ovario de una flor masculina. Se señalan los funículos amorfos (Guerrero Negro). **D.** Fotografía de la población de estudio en Cataviña. **E.** Fotografía de la población de estudio en Guerrero Negro.

## **Desarrollo del gineceo**

### **Desarrollo normal del óvulo**

Tanto el morfo hermafrodita como el morfo femenino presentaron un desarrollo similar del gineceo. En una fase temprana es posible observar como los funículos de los óvulos se curvan, se observa la nucela rodeada parcialmente por el tegumento interno. En la nucela, una célula subepidérmica se divide mitóticamente formando una célula parietal y una célula madre de la megaspora, implicando un desarrollo crasinucelado (Fig. 5A). Posteriormente en el desarrollo el tegumento interno va rodeando a la nucela y el tegumento externo se distingue únicamente en la región dorsal, ya que no hay diferenciación cerca del funículo debido a la curvatura de éste, al centro de la nucela se encuentra la célula madre de la megaspora (Fig. 5B). La nucela está cubierta completamente por el tegumento interno, el cual forma el micrópilo. Por su parte el tegumento externo cubre al tegumento interno casi por completo dejando expuesto el micrópilo. En la región ventral del funículo se desarrollan tricomas (Fig. 5C). La célula madre de la megaspora entra en meiosis y de una de las cuatro megasporas se desarrolla el saco embrionario, el cual está formado por dos células sinérgidas, una ovocélula (Fig. 5D, E), una célula central y tres antípodas. Se observó que la entrada del tubo polínico se presenta por la región del micrópilo, así como la degradación de las células sinérgidas, las cuales se observaron hipertrofiadas. Se observan múltiples granos de almidón en la región que comprendía el citoplasma de la célula central, así como diversos núcleos del endospermo nuclear (Fig. 5F).





**Fig. 5. Óvulos de flores femeninas y hermafroditas.**

**A.** Óvulo con nucela y primordio de tegumento interno. **B.** Óvulo joven cubierto por dos tegumentos en etapa de célula madre de la megaspora. **C.** Óvulos bien formados. Se señalan los tricomas del funículo **D.** Corte longitudinal de óvulo, se observan una sinérgida y la ovocélula **E.** Corte longitudinal de óvulo, donde se distingue la ovocélula. **F.** Corte longitudinal de óvulo con núcleos polares (flecha negra) rodeados de almidón y el aparato ovocelular.

**Acrónimos:** **Cmme**, Cédula madre de la megaspora; **Cp**, Célula parietal; **Fu**, Funículo **Nu**, Nucela; **Oc**, Ovocélula; **Pd**, Protodermis; **Sin**, Células sinérgidas; **Te**, Tegumento externo; **Ti**, Tegumento interno.

### **Desarrollo anómalo del óvulo**

Los individuos que se categorizaron como masculinos desarrollan óvulos anómalos. En etapas relativamente avanzadas (comparadas con las flores femeninas y hermafroditas) los primordios de óvulos cuentan con una diferenciación incipiente, con primordios nucelares que se dividen intensamente (Fig. 6A). La gran mayoría de los óvulos continúan el desarrollo alargándose y formando tricomas en el funículo. La nucela presenta una escasa diferenciación y se distingue como una ligera protuberancia en el ápice del funículo, sin embargo no hay formación de primordios de tegumentos (Fig. 6B).

En flores cercanas a la antesis se encontraron algunos funículos que no desarrollaban curvatura alguna, pero formaban un tegumento externo que no cubre al tegumento interno ni a la nucela (Fig. 6C). En cortes histológicos se observa que la nucela es cubierta por un tegumento interno que se compone de tres estratos de células parenquimáticas. El tegumento interno forma la región micropilar. Al centro de la nucela se puede distinguir a la célula madre de la megaspora (Fig. 6D). En flores postantesis se llegaron a encontrar algunos óvulos con sacos embrionarios que desarrollan un aparato ovocelular (Fig. 6E), una célula central y tres células antípodas (Fig. 6F).

### **Estilo y estigma**

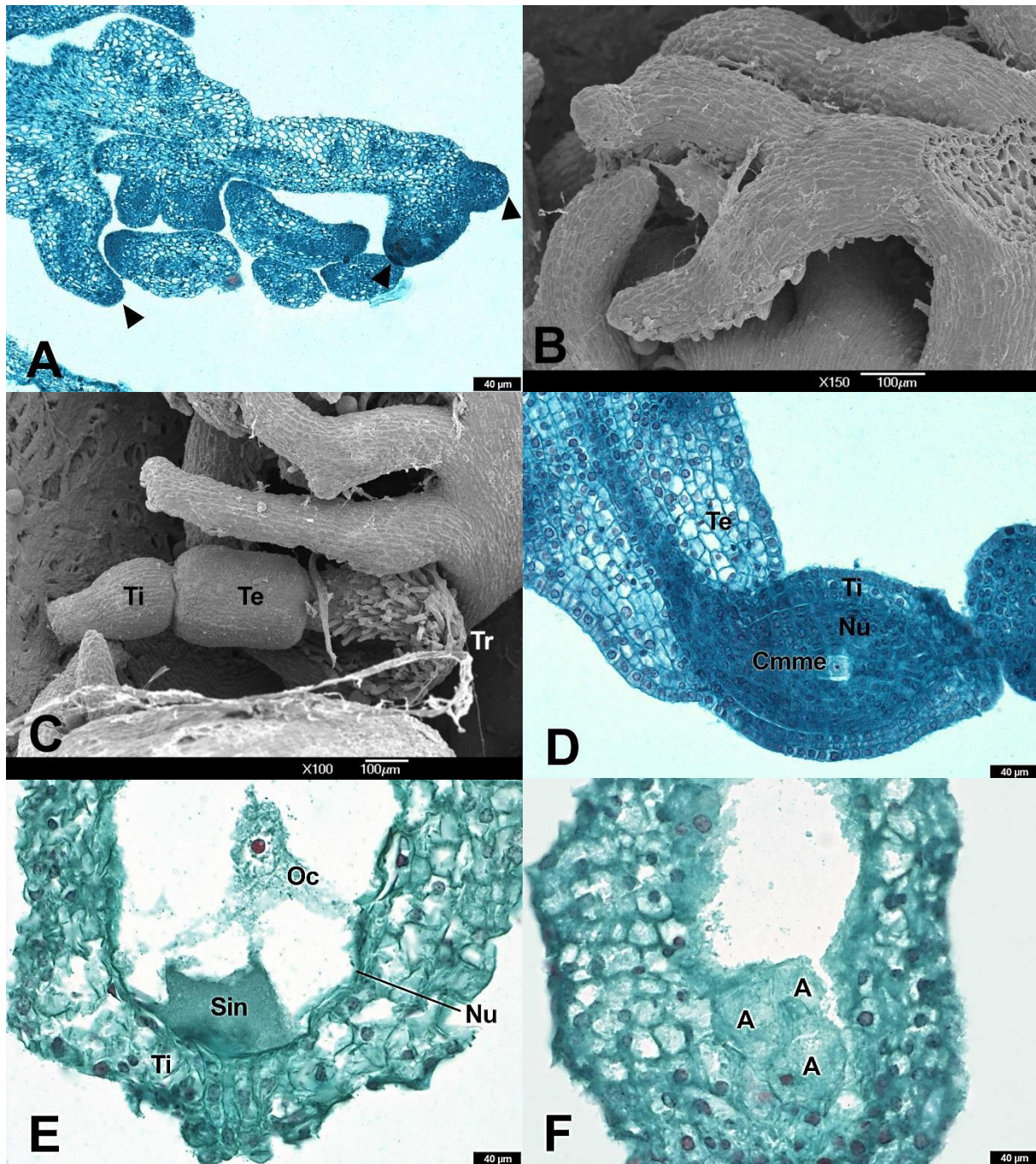
La morfología del pistilo fue similar en individuos femeninos, masculinos y hermafroditas. En todos los sexos se observó que el estilo es semisólido y tiene forma cilíndrica (Fig. 7A). Éste desarrolla una epidermis externa uniestratificada, con paredes celulares delgadas. Adyacente a la epidermis se encuentran varios estratos de células parenquimatosas, así como células de mucílago. Estas células se encuentran asociadas a los haces vasculares, los cuales son variables en número, que va de seis a ocho, siendo iguales al número de lóbulos estigmáticos



desarrollados en cada flor. Los haces vasculares forman un anillo alrededor del parénquima, el cual, a su vez, rodea al tejido de transmisión, conformado por células secretoras compactas. El tejido de transmisión forma amplias proyecciones radiales (crestas) hacia el parénquima. La epidermis interna del estilo está formada por células parenquimáticas papilosas, las cuales en algunas ocasiones albergan material ergástico (Fig. 7B).

Los estigmas se componen de seis a ocho lóbulos redondeados. En los lóbulos se desarrolla una epidermis adaxial (haz) papilosa con inclusiones en su interior (probablemente taninos), y una epidermis abaxial lisa y con una cutícula engrosada. El tejido de transmisión se encuentra adyacente a las papilas estigmáticas y tiene forma de U. Al centro del lóbulo se desarrolla un haz vascular rodeado por abundantes células de mucílago (Fig. 7C, D).

Algunos estigmas procesados para observaciones en el MEB, presentaron una gran cantidad de granos de polen adheridos, los cuales en su gran mayoría presentaban una forma irregular (Fig. 7E). Los cortes histológicos realizados también demuestran que hay adherencia entre granos de polen con citoplasma y que presentan una forma irregular (Fig. 7F).

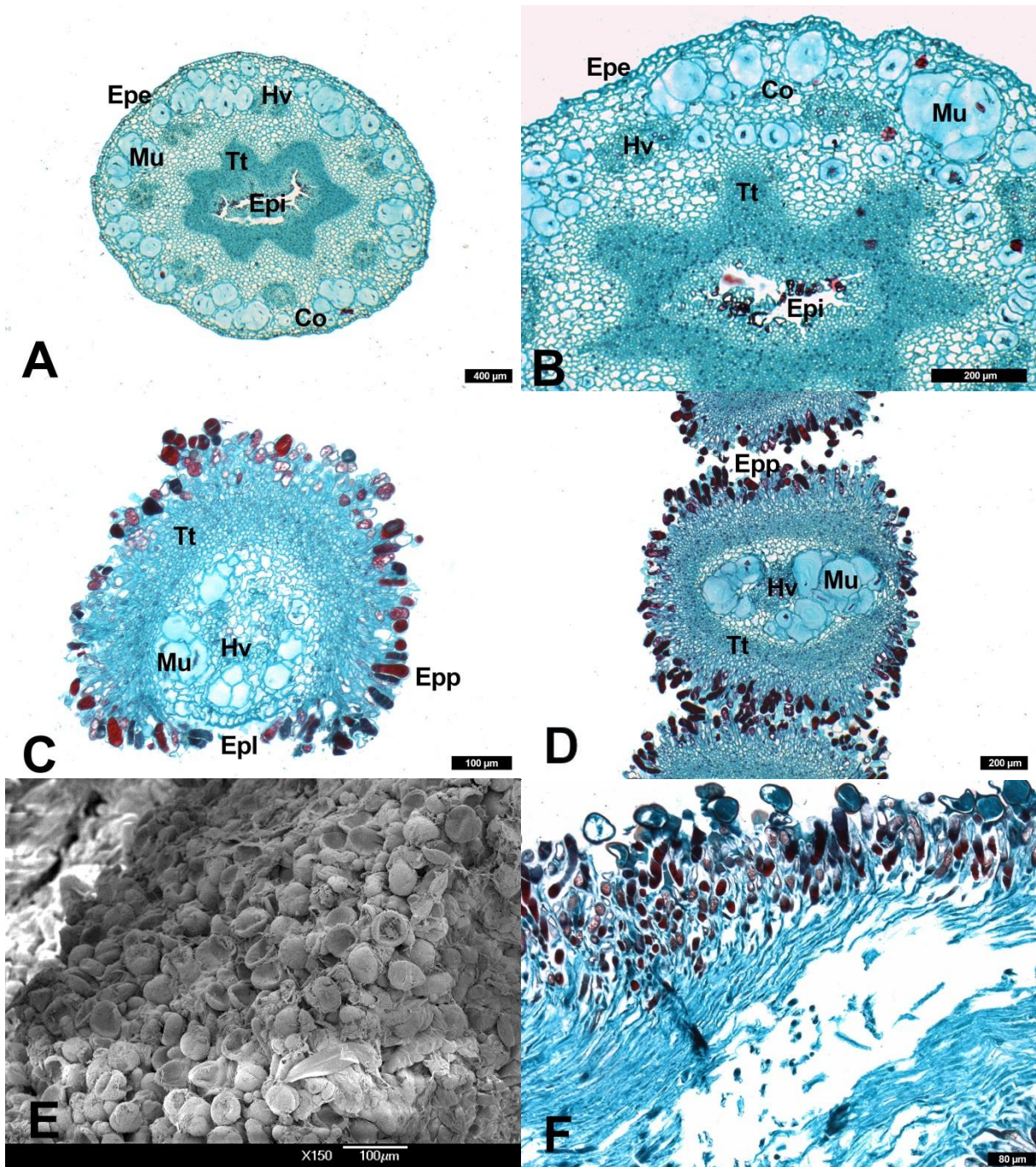


**Fig. 6. Óvulos de flores masculinas.**

**A.** Primordios de óvulos con escasa diferenciación, se señalan las nucelas **B.** Primordios de óvulos con poca diferenciación nucelar, los funículos con tricomas ventrales. **C.** Primordios de óvulos con tegumento interno rodeando a la nucela, el externo con crecimiento anómalo, sin cubrir al tegumento interno, funículo largo con tricomas. **D.** Corte histológico de primordio ovular como el de la figura **C** en etapa de la célula madre de la megaspora, rodeada por nucela y tegumento interno, el externo atrás del interno. **E.** Saco embrionario de flor postantesis, que exhibe restos de nucela degradándose, así como un tegumento interno que la recubre. **F.** Saco embrionario mostrando las células antípodas.

**Acrónimos:** **A,** Antípodas; **Cmme,** Célula madre de la megaspora; **Fu,** Funiculo; **Nu,** Nucela; **Oc,** Ovocélula; **Sin,** Sinérgidas; **Ti,** Tegumento interno; **Te,** Tegumento externo; **Tr,** Tricomas.





**Fig. 7. Anatomía del estilo y estigma.**

**A.** Corte transversal del estilo de flor masculina. Algunas células de las epidermis interna y externa con taninos. **B.** Acercamiento al tejido de transmisión de un estilo de flor femenina en corte transversal. **C.** Acercamiento a un lóbulo estigmático de flor femenina; se distingue las células de la epidermis adaxial de forma papilosa y con taninos, la epidermis abaxial con células cúbicas. El tejido de transmisión tiene forma de "U". **D.** Lóbulo estigmático de individuo masculino con anatomía similar a la forma femenina **E.** Lóbulo estigmático de morfo hermafrodita, se observan adheridos diversos granos de polen con forma colapsada e irregular. **F.** Cortes histológicos de estigma con mismo tipo de granos de polen adheridos. **Acronimos:** Co, Córtex; Epe, Epidermis externa; Epi, Epidermis interna; Epp, Epidermis papilosa; Hv Haz vascular. Mu, Célula de mucílago; Tt, Tejido de transmisión.

## **Desarrollo del androceo**

Todos los morfos lucen idénticos en cuanto al desarrollo del androceo se refiere en etapas tempranas, hasta previo a la meiosis de las células madres de las microsporas (CMMi). Antes de iniciar la meiosis, la pared de la antera de todos los morfos se compone de una epidermis lisa, un endotecio, una capa media y un tapete, el cual se observa ligeramente más grande que el resto de los estratos de la antera. Las CMMi tienen un tamaño considerablemente grande. En el tejido conectivo de la antera se observan drusas y cristales poligonales. Es en la fase de tétradas cuando se distinguen distintas características en el desarrollo de los granos de polen.

### **Desarrollo normal**

Este desarrollo normal se presentó en algunos individuos masculinos y hermafroditas. En estas plantas, la deposición de calosa, se da de manera regular sobre las CMMi. Al iniciarse la deposición de calosa el tapete comienza a hipertrofiarse. Cuando ya se ha llevado a cabo la meiosis y se ha formado una tétrada tetraédrica, la capa media luce adelgazada y el tapete hipertrofiado. Éste se tiñe de rojo con la tinción safranina-verde rápido (Fig. 8A). En una etapa inmediata posterior, la calosa de las tétradas se degrada, lo que permite la separación de las microsporas (Fig. 8B). En esta fase de microsporas libres el tapete se observa binucleado, la capa media completamente colapsada, el endotecio y la epidermis tienen una escasa diferenciación (Fig. 8C). Se observa que las microsporas presentan pared celular continua, aún conservan parcialmente la forma que presentaba en la tétrada, el citoplasma es poco abundante y son uninucleadas (Fig. 8D). Al continuar el desarrollo el endotecio empieza a presentar engrosamientos desiguales y el tapete se va degradando. Los granos de polen lucen bicelulares, su citoplasma se observa vacuolizado, la pared del grano de polen ha formado tanto intina como exina y su forma es esferoidal (Fig. 8E). Ya en la anthesis la pared

de la antera se compone de epidermis y de endotecio con engrosamientos desiguales. La región del estomio y del septo se degradan para la posterior dehiscencia y liberación de los granos de polen tricelulares (Fig. 8F).

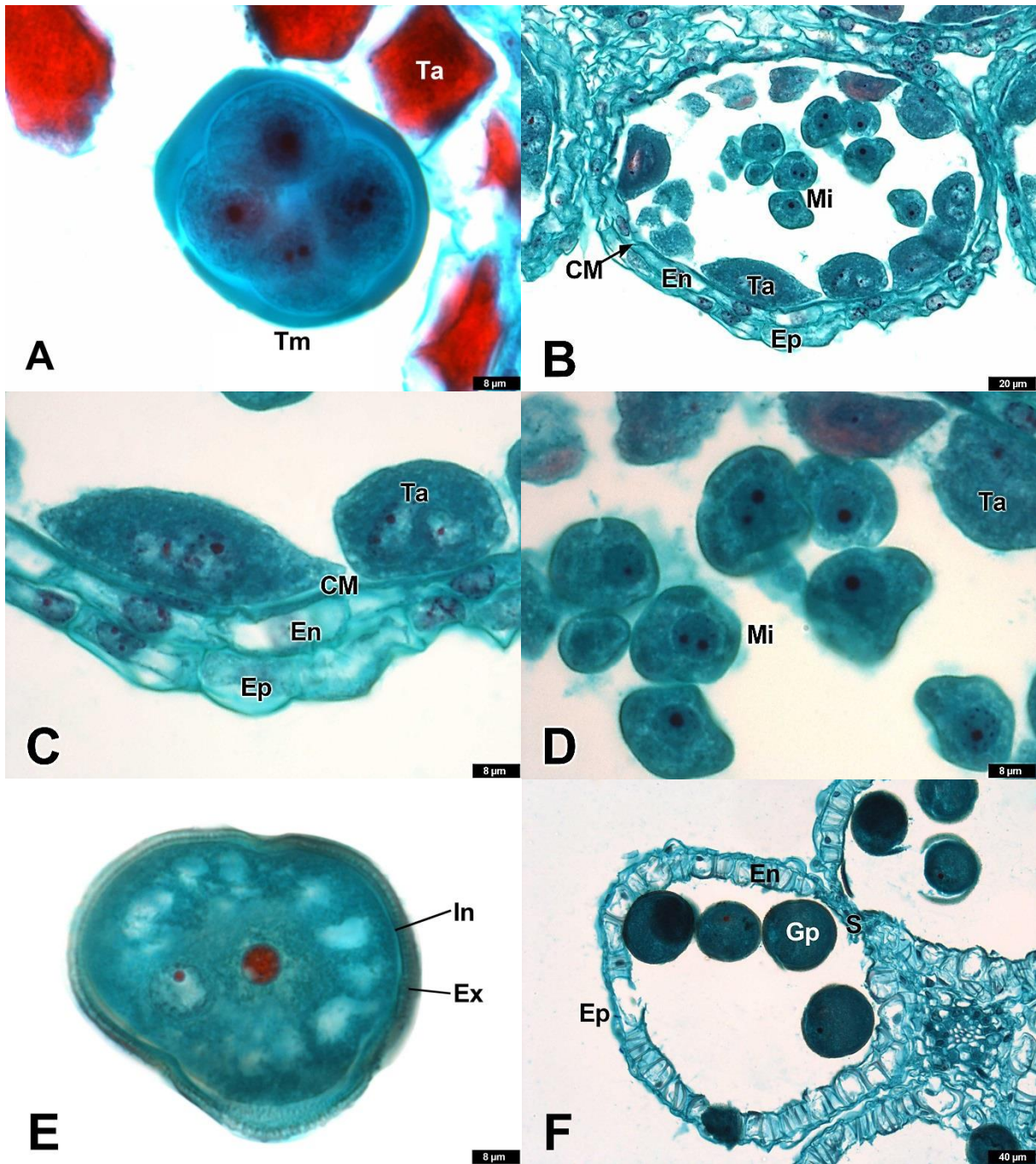
### El grano de polen normal

Los granos de polen de las flores hermafroditas y masculinas normales (Fig. 9A, B, C) comparten las siguientes características: **Abertura:** tricolpada, **Ornamentación de la abertura:** equinada, **Exina:** microequinada, perforada, columelada, tectada, **Asociación:** mónada, **Simetría:** radial, **Polaridad:** isopolar. Entre todos los granos de polen estudiados, la forma del grano de polen más común fue prolato esferoidal (Fig. 9D), aunque también fue frecuente el subprolato (Fig. 9E). Las características medidas de las muestras acetolisadas se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de granos de polen normal de plantas de la localidad de Guerrero Negro.

Planta	Eje Polar µm Promedio (intervalo)	Eje Ecuatorial µm Promedio (intervalo)	Espesor promedio de exina (µm)	Formas %
<b>Hermafrodita (n= 25)</b>	79.52 (71.14 a 92.69)	65.48 (56.7 a 75.99)	2.45	Subprolato (64) Oblato esferoidal (16) Prolato (12) Prolato esferoidal (8)
<b>Masculina (n= 25)</b>	74.35 (69.13 a 81.63)	69.86 (58.87 a 76.58)	2.92	Prolato esferoidal (64) Oblato esferoidal (20) Subprolato (16)

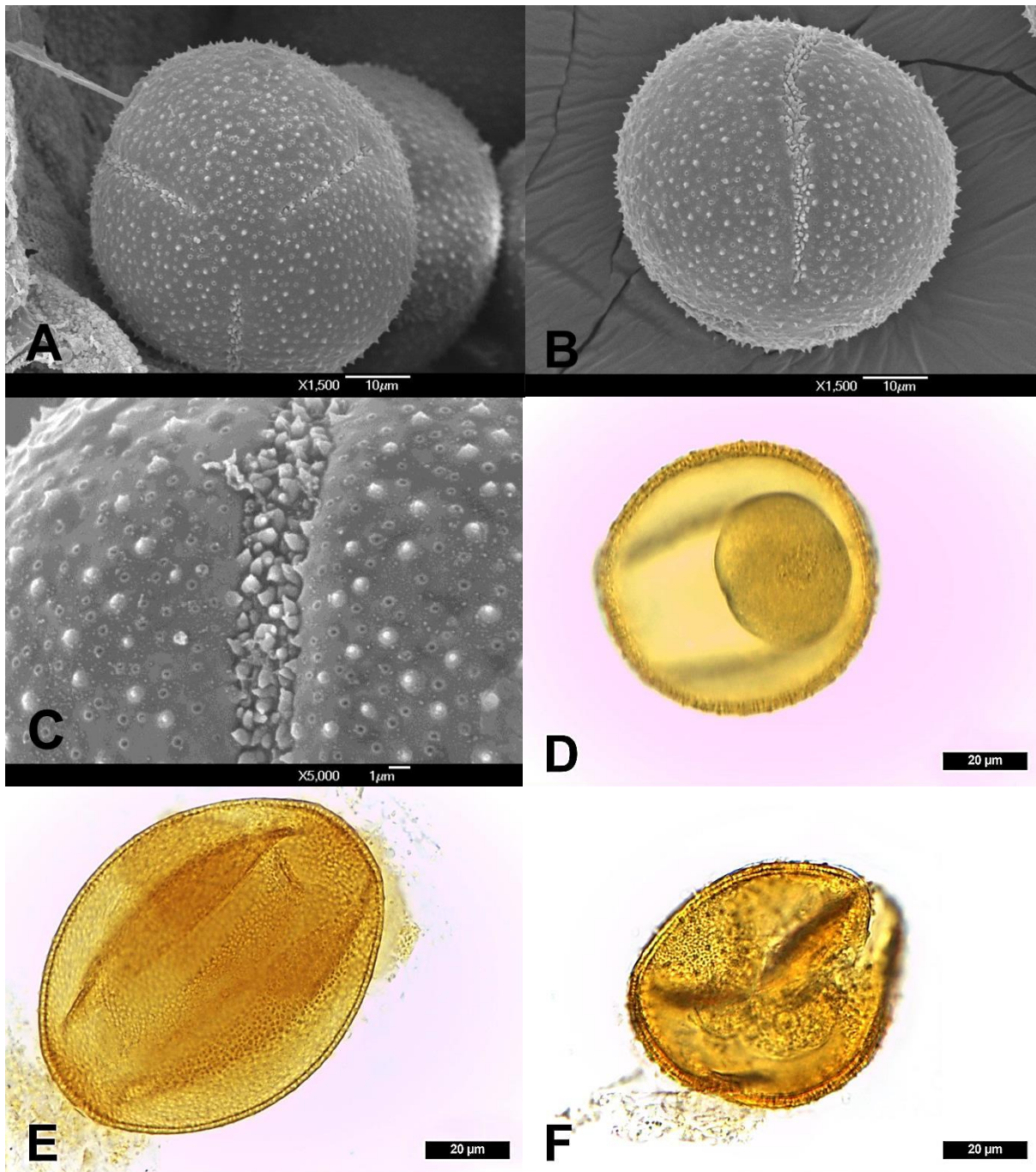




**Fig. 8. Desarrollo de androceo normal.**

**A.** Acercamiento a una tétrada de microsporas con el tapete hipertrofiado. **B.** Microsporangio de apariencia normal. La capa media luce colapsada. Tapete binucleado; en el centro las microsporas libres de la calosa. **C.** Acercamiento a la pared de antera. **D.** Microsporas recién liberadas de la tétrada, forma irregular. **E.** Grano de polen bicelular con citoplasma vacuolizado. **F.** Antera madura cercana a la dehiscencia. Región del estomio y septo adelgazados.

**Acrónimos:** **CM**, Capa media; **En**, Endotecio; **Ep**, Epidermis; **Ex**, Exina; **Gp**, Grano de polen; **In**, Intina; **Mi**, Microspora; **S**, Septo; **Ta**, Tapete; **Tm**, Tétrada de microsporas.



**Fig. 9. Granos de polen de los morfos hermafrodita y masculino.**

**A.** Vista polar morfo masculino. Se observa como las tres aberturas (colpos) confluyen hacia el área del apocolpio **B.** Vista ecuatorial del morfo hermafrodita. **C.** Acercamiento a la exina, la cual es perforada y microequinada. Abertura con membrana microequinada. **D.** Grano de polen prolato esferoidal **E.** Grano de polen subprolato. **F.** Grano de polen anomalo masculino.

## Desarrollo anómalo del androceo

En los tres morfos florales, se encontraron anomalías en el desarrollo normal del androceo, las cuales se resumen en la Tabla 2 y se describen de manera detallada a continuación.

**Tabla 2.** Resumen de las irregularidades presentadas en el desarrollo de los distintos sexos de *Pachycereus pringlei*.

Morfo	Características durante el desarrollo
<b>Hermafrodita</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Tétradas tetraédricas, granos de polen plegados, deposición de exina normal, algunos granos entran en proceso de MCP.</li><li>•Granos de polen más grandes, con exina más delgada y una menor densidad de poros y microespinas en la exina. Algunas anteras en etapa temprana del desarrollo muestran granos de polen amorfos.</li></ul>
<b>Masculino</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Tétradas tetraédricas, granos de polen plegados, deposición de exina normal.</li></ul>
<b>Femenino</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Tétradas anómalas, microsporas libres con forma irregular, posible segregación irregular del ADN, pérdida de citoplasma de los granos de polen. Exina más gruesa. Deposición de exina anormal, sin patrón evidente.</li></ul>

## Flores hermafroditas y masculinas

Algunos individuos masculinos y hermafroditas presentaron flores con anteras que producían granos de polen completamente normales y también flores que presentaban irregularidades en la forma y el desarrollo de los granos de polen. En la fase de tétradas, la apariencia de las microsporas no difiere de aquellas que se producen en las anteras que forman granos de polen de forma regular, pero las células del tapete lucen hipertrofiadas y su citoplasma teñido en rojo (Fig. 10A). Una vez que las microsporas se han separado, éstas comienzan a formar la pared de exina, la cual es continua, pero las formas de los granos de polen son anómalas (Fig. 10B). Los granos de polen pueden llegar a formar plegamientos normales en las regiones de las aberturas, en una fase bicelular, aunque la forma de estos granos de polen es claramente diferente (Fig. 10C).

En otras muestras cercanas a la antesis se observó que la epidermis empieza a almacenar taninos, el endotecio se engrosa, el tapete se desintegra por completo, no obstante, algunos



granos de polen se observan aún unicelulares, con el citoplasma vacuolizado y parcialmente colapsado, ya que se separa de la pared de la exina. Algunos granos de polen forman una gran vacuola que desplaza el núcleo a la periferia (Fig. 10D).

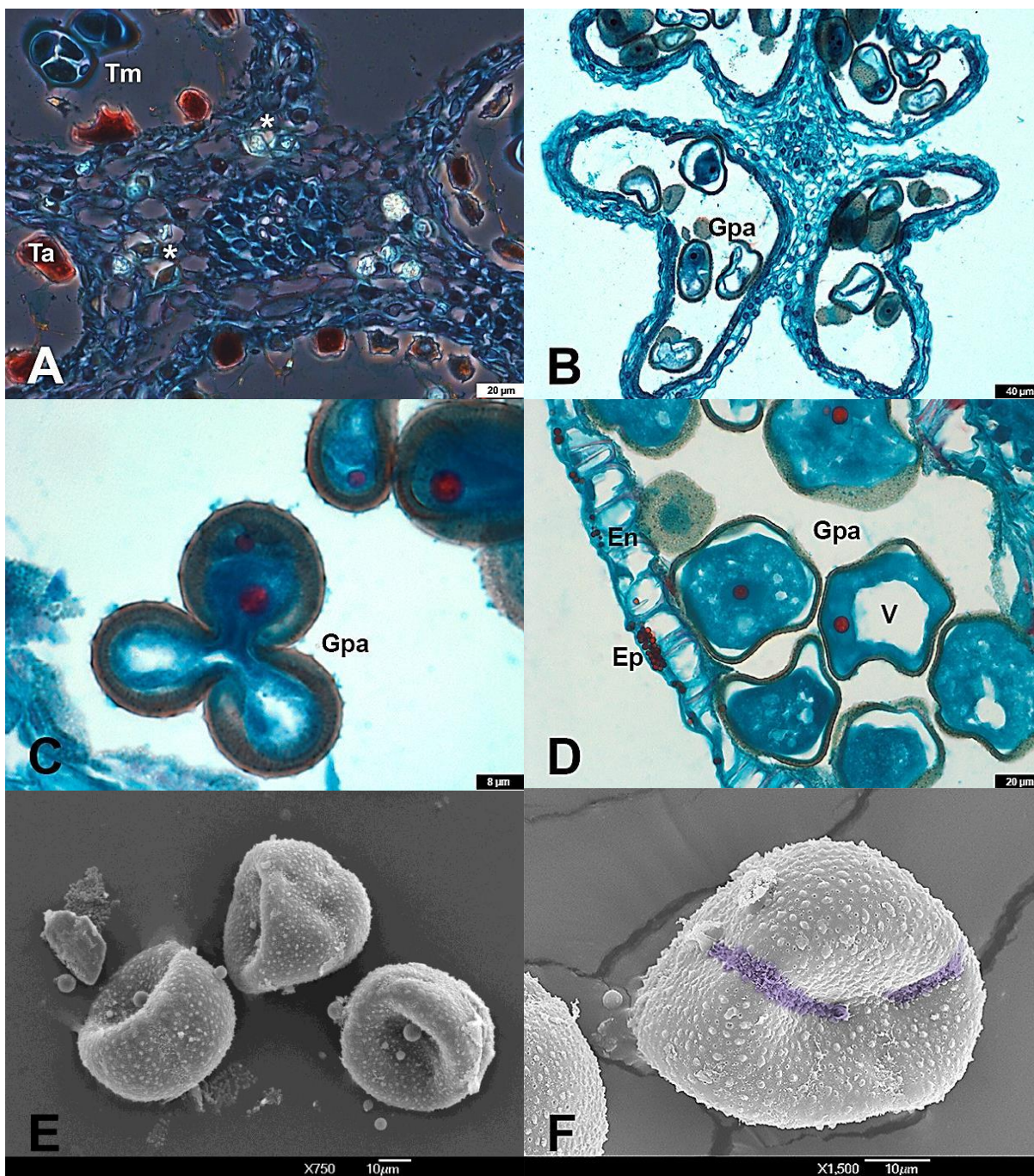
Cuando los granos polen de estas plantas hermafroditas y masculinas se dispersan, éstos son amorfos debido a que se encuentran plegados (Fig. 10E). Los granos presentan colpos y la ornamentación de la exina es microequinada y perforada (Fig. 10F).

En la localidad de Cataviña se encontró una planta que produjo diversas irregularidades en la formación del grano de polen (*cf*r Tabla 3, Hermafrodita3). Se encontraron muy pocas anteras en una etapa del desarrollo en la que el tapete fuese persistente y aquellas en las que se encontró, la forma de los granos de polen eran completamente deformes (Fig. 11A). También se observó que otras anteras del mismo individuo desarrollan granos de polen que pasan por la fase de vacuolización y posteriormente se observan granos de polen con una exina delgada y un mayor volumen. El endotecio presenta engrosamientos y algunas células de la epidermis albergan taninos (Fig. 11B). Probablemente a la hora de la dispersión estos granos de polen son tricelulares, ya que en algunos cortes se identificaron los núcleos de las células espermáticas (Fig. 11C). Se observaron anteras que sólo desarrollaban granos de polen en alguno de los lóculos (Fig. 11D).

La ornamentación de la exina fue igual a los granos de polen de los individuos masculinos y hermafroditas normales; sin embargo, aparentemente la densidad de perforaciones y de microespinas en la exina es menor (Fig. 11E, F).

### **El grano de polen anómalo masculino y hermafrodita**

Las pruebas de acetólisis confirmaron que los granos de polen de las flores hermafroditas y masculinas tienen exina con forma anormal (Fig. 9F). El grosor de la exina de la mayoría de

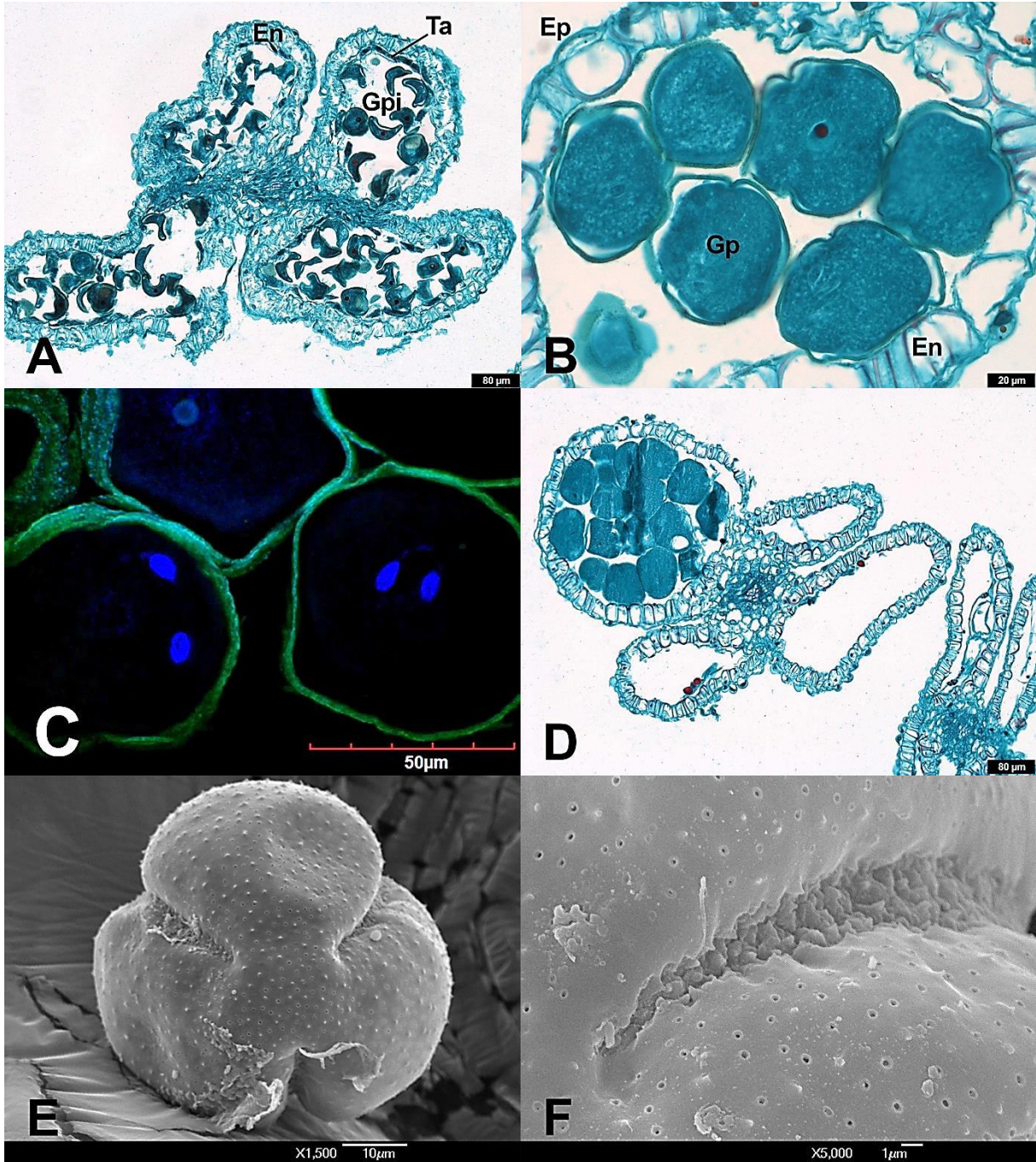


**Fig. 10. Desarrollo anormal del androceo de hermafroditas y masculino.**

**A.** Antera en fase de tétradas de microsporas, tapete hipertrofiado. Cristales poligonales (asterisco) y drusas el conectivo **B.** Granos de polen con exina continua pero de forma irregular. **C.** Grano de polen bicelular tricolpado. **D.** Granos de polen anómalos con citoplasma vacuolizado. El tapete se ha degradado por completo, endotecio con engrosamientos y epidermis con taninos. **E.** Granos de polen plegados. **F.** Acercamiento a grano de polen de forma irregular.

**Acrónimos:** **En**, Endotecio; **Ep**, Epidermis; **Gpa**, Grano de polen anómalo; **Ta**, Tapete; **Tm**, Tétrada de microsporas; **V**, Vacuola.





**Fig. 11. Planta hermafrodita de Cataviña.**

**A** Granos de polen irregulares en forma. Tapete delgado y engrosamientos del endotecio . **B.** Granos de polen de mayor tamaño y con exina delgada. **C.** Corte histológico teñido con DAPI y TUNEL, se observan dos núcleos, probablemente núcleos espermáticos. **D.** Antera con solo un lóculo funcional **E.** Vista polar del grano de polen. **F.** Acercamiento a la abertura.

**Acrónimos:** **En,** Endotecio; **Ep,** Epidermis; **Gp,** Grano de polen; **Gpi,** Grano de polen irregular; **Ta,** Tapete.

las muestras fue similar al de los granos de polen clasificados como normales, con excepción de la Hermafrodita3 (Tabla3). Cabe destacar que muchos granos eran susceptibles a reventarse durante el procedimiento de acetólisis, por lo cual, las pruebas se realizaron disminuyendo el tiempo que se dejaron las muestras en la mezcla acetólica. En consecuencia muchas veces el material citoplasmático no salía por completo.

**Tabla 3.** Características de los granos de polen anómalos de plantas hermafroditas y masculinas de las localidades de Cataviña y Guerrero Negro.

<b>Plantas (Sexo, Localidad)</b>	<b>Eje Polar µm Promedio (intervalo)</b>	<b>Eje Ecuatorial µm Promedio (intervalo)</b>	<b>Espesor de exina promedio (µm)</b>	<b>Formas %</b>
<b>Hermafrodita1, Cataviña (n= 25)</b>	71.98 (62.53 a 87.5)	67.13 (56.33 a 83.64)	2.84	Prolato esferoidal (64) Subprolato (20) Oblato esferoidal (16)
<b>Hermafrodita2, Cataviña (n= 25)</b>	65.83 (54.01 a 75.36)	61.98 (52.09 a 70.5)	2.66	Prolato esferoidal (64) Oblato esferoidal (20) Subprolato (12) Prolato (4)
<b>Hermafrodita3, Cataviña (n= 25)</b>	84.67 (71.85 a 97.59)	79.06 (64.38 a 88.86)	1.46	Prolato esferoidal (60) Subprolato (24) Oblato esferoidal (16)
<b>Masculino1, Guerrero Negro (n= 25)</b>	65.67 (58.22 a 71.37)	52.80 (47.26 a 59.58)	2.80	Subprolato (60) Prolato (24) Prolato esferoidal (16)
<b>Masculino2, Guerrero Negro (n= 25)</b>	73.03 (59.73 a 87.61)	65.03 (55.9 a 75.75)	3.07	Prolato esferoidal (60) Subprolato (36) Olato esferoidal (4)

## **Flores femeninas**

Durante la fase de CMMi se observa que la pared de la antera se compone de epidermis, endotecio, capa media y tapete. La deposición de calosa sobre las CMMi se da de manera irregular (Fig. 12A), al igual que la apariencia de las tétradas y algunas células del tapete lucen hipertrofiadas (Fig. 12B). Una vez que las tétradas se separan, el contorno de las microsporas libres tiene un halo (probablemente de calosa), el cual envuelve de manera irregular a las microsporas. El tapete es binucleado (Fig. 12C).

En una preparación se observó que cuando el tapete se encuentra desintegrándose algunos granos de polen desarrollaban una exina discontinua, con zonas engrosadas o adelgazadas. De igual manera parece ser que durante la meiosis no se llevó a cabo la separación correcta del material genético, ya que con la tinción safranina-verde rápido se tiñen de rojo unos núcleos hipertrofiados en la periferia, y otros con apariencia normal al centro del grano de polen (Fig. 12D). En cortes histológicos de estas mismas muestras pero teñidas con DAPI, se observa que los núcleos hipertrofiados se tiñen intensamente, comparados con los núcleos normales (Fig. 12E).

En una fase posterior se observa que la gran mayoría de los granos de polen contienen sólo un núcleo, sin embargo la pared del grano de polen es discontinua y desarrolla una exina de mayor grosor que los granos de polen de los morfos hermafroditas y masculinos. Excepcionalmente se encontraron granos de polen con tres núcleos de tamaño similar y escaso citoplasma (Fig. 12F).

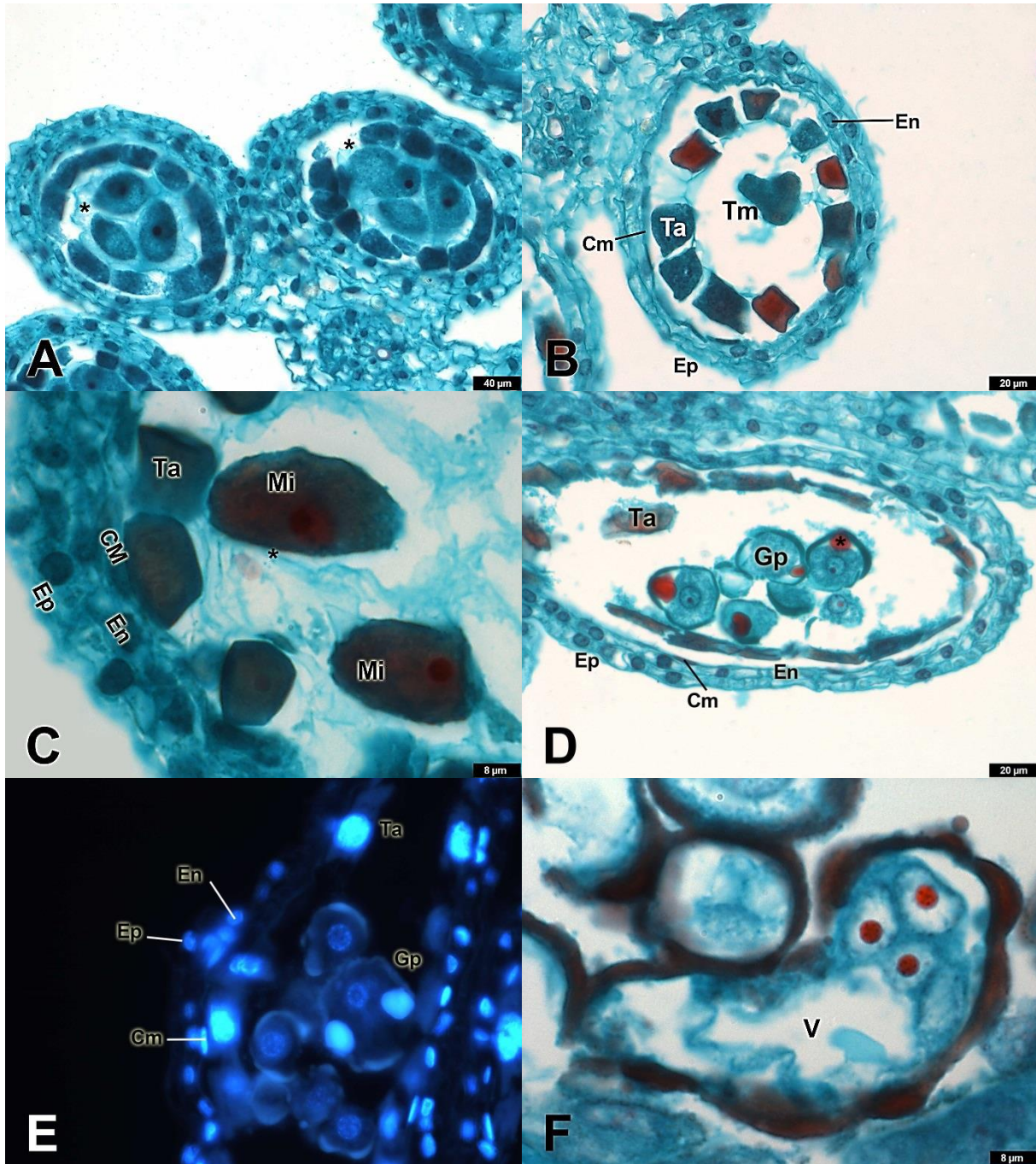
Cerca de la anthesis la gran mayoría de las anteras presentan una pared compuesta de epidermis y endotecio engrosado. Los lóculos de las anteras contienen restos de granos de polen colapsados (Fig. 13A), aunque en algunos cortes también se encontraron granos de polen con citoplasma y una cubierta irregular (Fig. 13B).

### **El grano de polen del morfo femenino**

Por lo general todos los granos de polen presentaron una pared de exina discontinua y la gran mayoría pierden el citoplasma, sin poder distinguir la ornamentación de la exina en la mayoría de ellos, la forma de estos granos rara vez es esferoidal (Fig. 13C). Mediante la técnica de acetólisis se logró identificar que algunos granos de polen amorfos presentan una ornamentación de exina microequinada y perforada y llegan a desarrollar aberturas (Fig. 13D). Las aberturas son similares al tipo presente en las flores hermafroditas y femeninas; sin embargo, no existe el mismo patrón de deposición de la esporopolenina, ya que en estos granos se observan grandes cúmulos globulares (Fig. 13E).

En promedio el espesor de exina de las muestras de Guerrero Negro fue de 4.90  $\mu\text{m}$  y en Cataviña de 4.77  $\mu\text{m}$ . Estos valores contrastan con los obtenidos para las plantas hermafroditas y masculinas (*cfr.* Tabla 1 y 3). Existen diferencias significativas entre el espesor de exina de los granos de polen femeninos comparados con los morfos normales y anormales (hermafroditas y masculinos). La prueba Kruskal-Wallis arrojó un valor de 115.2 con una  $p < 0.0001$  (Fig. 14). Excepcionalmente algunos granos de polen conservan el citoplasma, e inclusive es persistente después del proceso de acetólisis (Fig. 13F). Todos los granos de polen de flores femeninas son dispersados en mónadas, son asimétricos, y no se puede distinguir su polaridad, por lo tanto se midió un diámetro de las regiones donde la pared era continua. El diámetro promedio de las muestras de Guerrero Negro fue de 63.78  $\mu\text{m}$  y en Cataviña de 60.55  $\mu\text{m}$ .

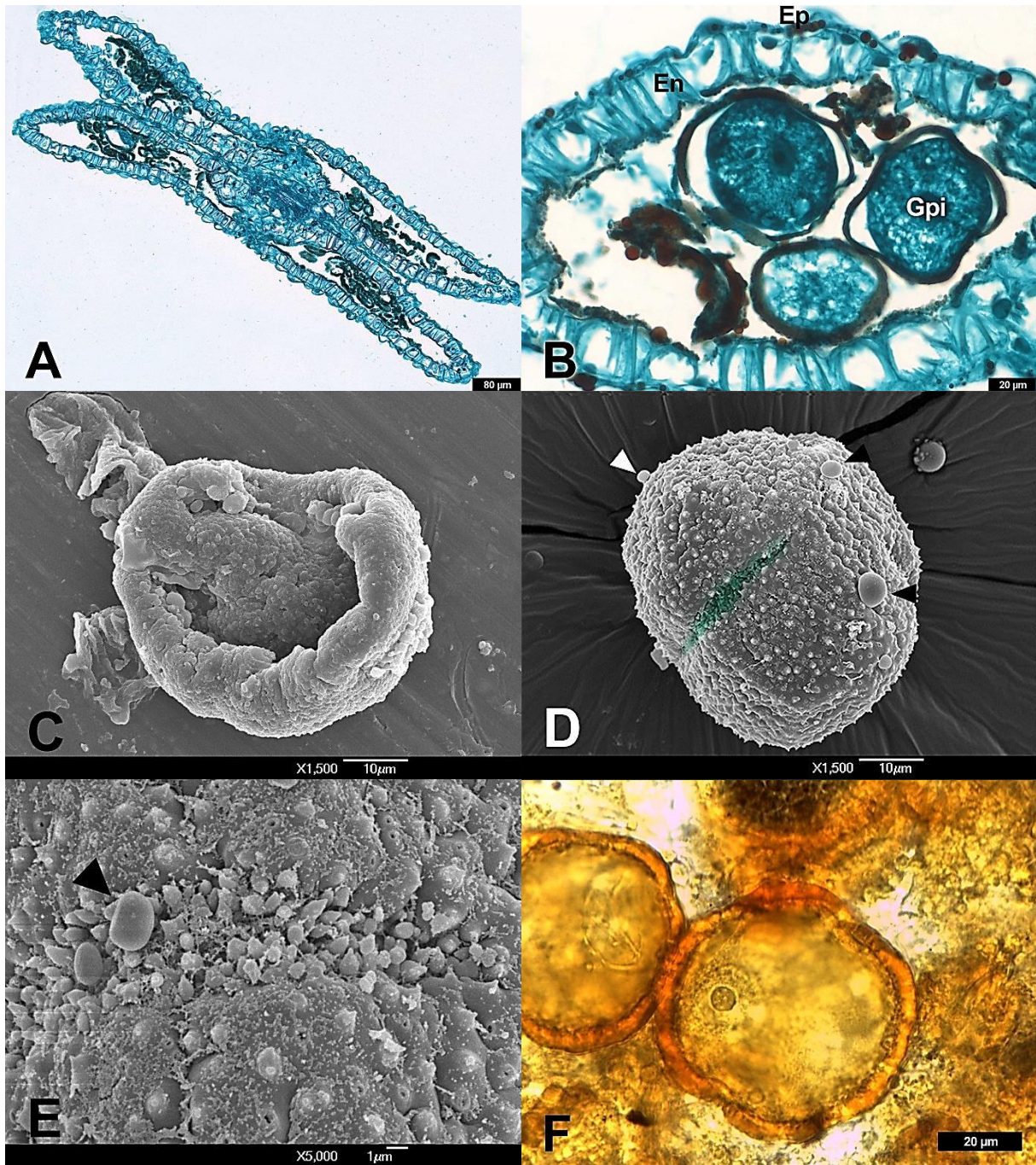




**Fig. 12. Anteras de flores femeninas.**

**A.** Antera en etapa de CMMi, se señalan depósitos irregulares de calosa (asteriscos). **B.** Tétrada amorfa, algunas células del tapete lucen hipertrofiadas. **C.** Microsporas libres con pared irregular (asterisco) **D.** Granos de polen con núcleos deformes (asterisco) . **E.** Tinción con DAPI de misma preparación anterior . Se evidencian núcleos. **F.** Grano de polen anómalo, con tres núcleos del mismo tamaño, grandes vacuólas y poco citoplasma.  
**Acrónimos:** **CM,** Capa media; **En,** Endotecio; **Ep,** Epidermis; **Gp,** Grano de polen; **Mi,** Microspora; **Ta,** Tapete; **Tm,** Tétrada de microsporas; **V,** Vacuola.



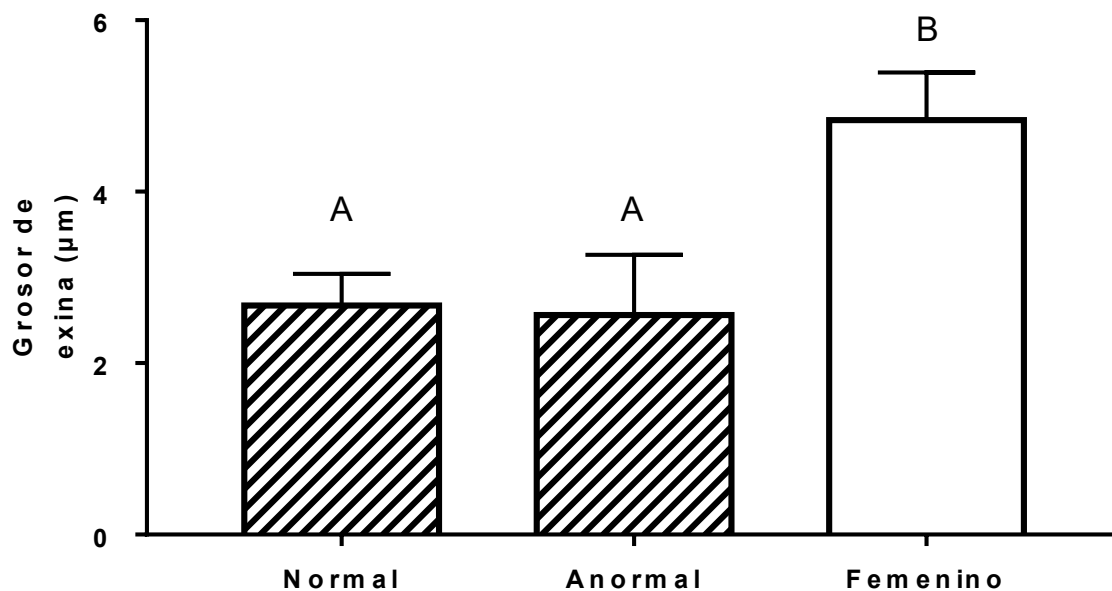


**Fig. 13. Androceo de morfo femenino.**

**A.** Antera cercana a la antesis con granos de polen colapsados. **B.** Antera con granos de polen irregulares. **C.** Micrografía de grano de polen colapsado. **D.** Grano de polen irregular, se señalan los depósitos globulares característicos del morfo **E.** Abertura de un grano de polen. Se señalan depósitos globulares. **F.** Grano de polen acetolizado se observa un núcleo atrapado.

**Acrónimos:** **En**, Endotecio; **Ep**, Epidermis; **Gpi**, Grano de polen irregular.





**Fig. 14.** Grosor de la exina de los granos de polen de *Pachycereus pinglei*. Se presenta el valor promedio acompañado de la desviación estandar. Existen diferencias significativas entre las letras A y B con una  $p < 0.0001$ .

## Prueba de TUNEL

Todas las pruebas de TUNEL se hicieron realizando controles negativos (Figs. 15, 16, 17) y positivos (Figs. 18, 19). Sin embargo, el tercer control positivo no se pudo fotografiar debido a que los cortes histológicos se despegaron del portaobjetos, y no se conservó material para realizar el control.

## Androceo de las flores hermafroditas

En las plantas hermafroditas se observó que una vez que se han liberado las microsporas de la tétrada, la cromatina de los núcleos de la capa media se encuentra fragmentándose, así como en algunas células del tapete. De igual manera se registran algunas células en la epidermis con fragmentación de cromatina, característica de la MCP (Fig. 20)

La planta hermafrodita que produce granos de polen de mayor tamaño, presentó células del endotecio y el estomio con signos de MCP (Fig. 21).

En las flores que presentaron granos de polen anómalos del morfo hermafrodita (*cf.* Fig. 10D) en anteras cercanas a la antesis también se encontró fragmentación del ADN de algunas células del endotecio y de la epidermis. Destaca que algunos núcleos de estos granos de polen dieron positivo para la prueba de TUNEL (Figs. 22, 23).

### **Androceo de las flores masculinas**

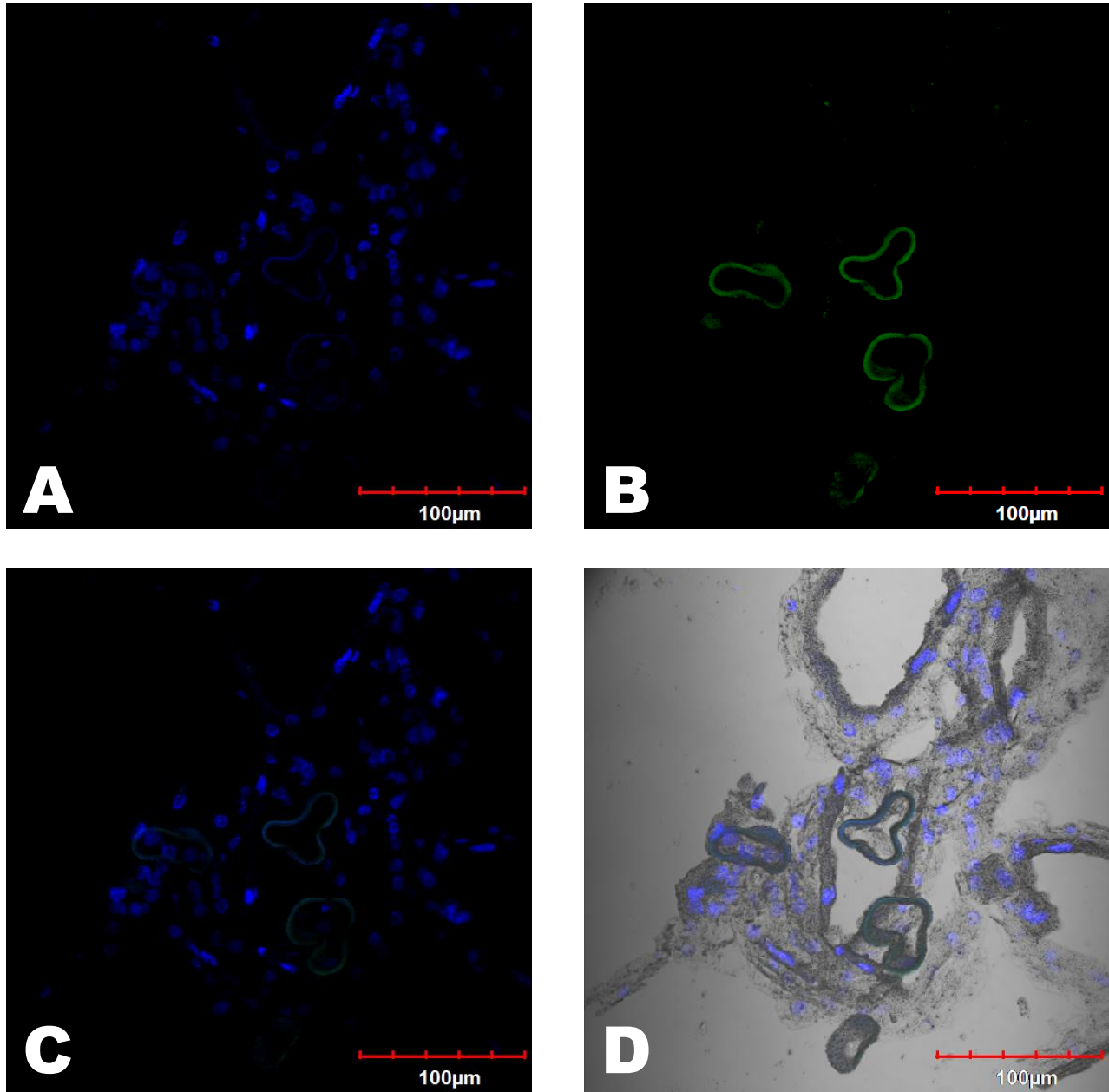
En el morfo masculino de forma irregular se observa que cuando el grano de polen ya presenta una exina con ornamentación, algunas células de la epidermis se encuentran con cromatina fragmentada, igual que las del tapete (Fig. 24)

### **Androceo de las flores femeninas**

En la fase de tétradas las anteras de flores femeninas presentan epidermis, endotecio, una capa media ya casi colapsada y un tapete. Las tétradas, son sumamente irregulares, sin embargo, no se registró ninguna señal positiva de fragmentación de ADN en ninguna célula de las anteras (Fig. 25). En una etapa posterior, los núcleos de los granos de polen, se tiñen con el DAPI, sin embargo en ninguno de ellos se observan signos positivos de fragmentación detectados con la prueba de TUNEL. De igual manera los núcleos del tapete se tiñen con DAPI, pero sólo autofluoresce en verde el contorno del tapete, probablemente debido a la esporopolenina. Algunas células de la epidermis presentan material genético fragmentado (Fig. 26).

En flores cercanas a la antesis, la epidermis de la antera alberga algunos taninos y el endotecio presenta engrosamientos y dentro del lóculo se observan cúmulos de granos colapsados, así como granos de polen con citoplasma en su interior, los cuales llegaron a

presentar sólo un núcleo (Fig. 27,28). En ninguna de las preparaciones experimentales se detectó que el material genético de estos granos se encontrase degradando.



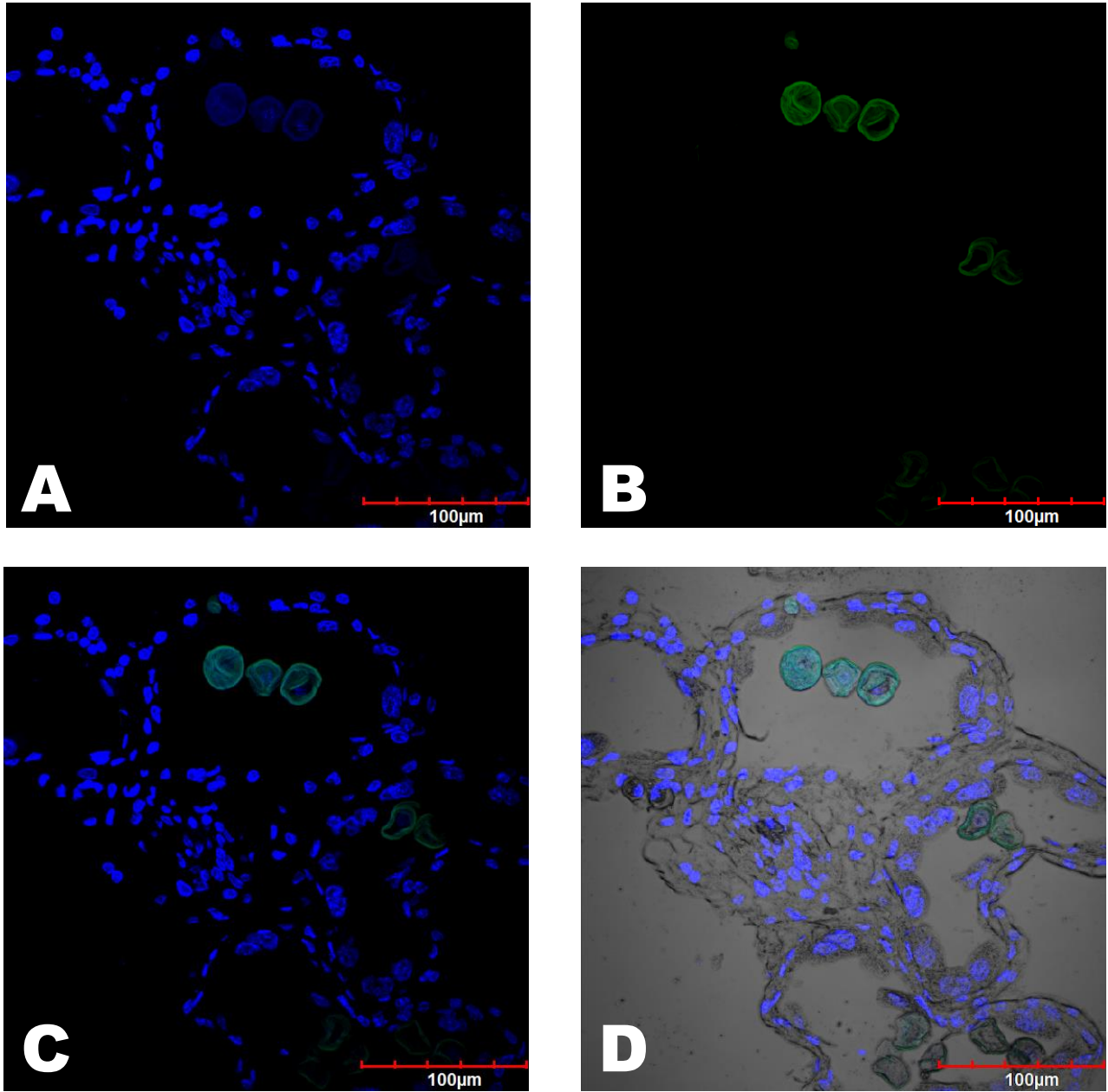
**Fig. 15. Control negativo (no se adiciona enzima TDT). Corte transversal de microsporangio de flor hermafrodita de *Pachycereus pringlei*.**

**A.** Observación para DAPI, los núcleos se tiñen en azul. Pared de los granos de polen con autofluorescencia.

**B.** Observación para TUNEL. Sólo la pared de los granos de polen es autofluorescente, pero los núcleos no se marcan.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones.

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.



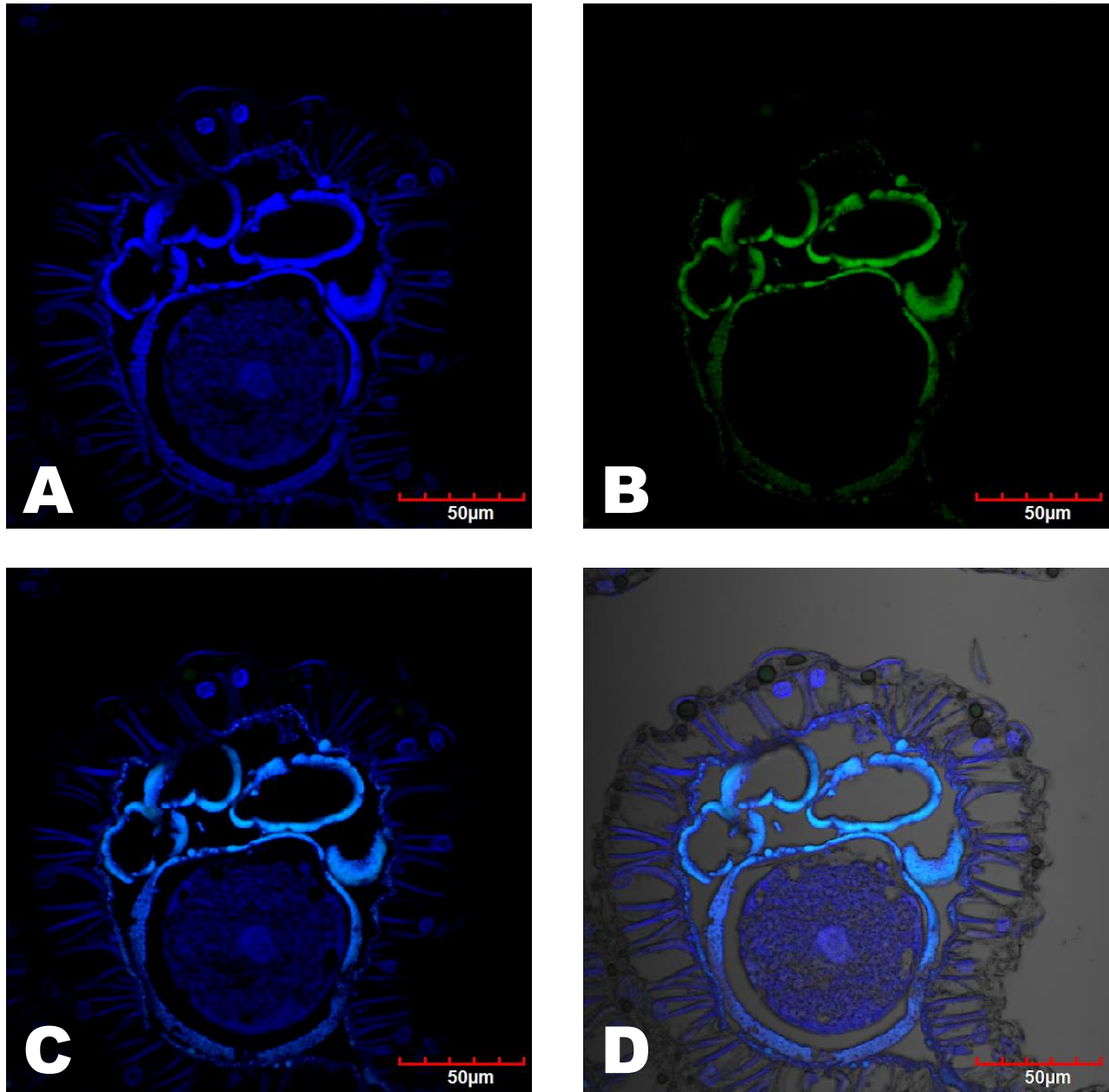
**Fig. 16. Control negativo (no se adiciona enzima TDT). Corte transversal de microsporangio de flor masculina de *Pachycereus pringlei*.**

**A.** Observación para DAPI, los núcleos se tiñen en azul. Pared de los granos de polen con ligera autofluorescencia.

**B.** Observación para TUNEL. Sólo la pared de los granos de polen autofluorescen, pero los núcleos no se marcan.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones.

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.



**Fig. 17. Control negativo (no se adiciona enzima TDT). Corte transversal de microsporangio de flor femenina de *Pachycereus pringlei*.**

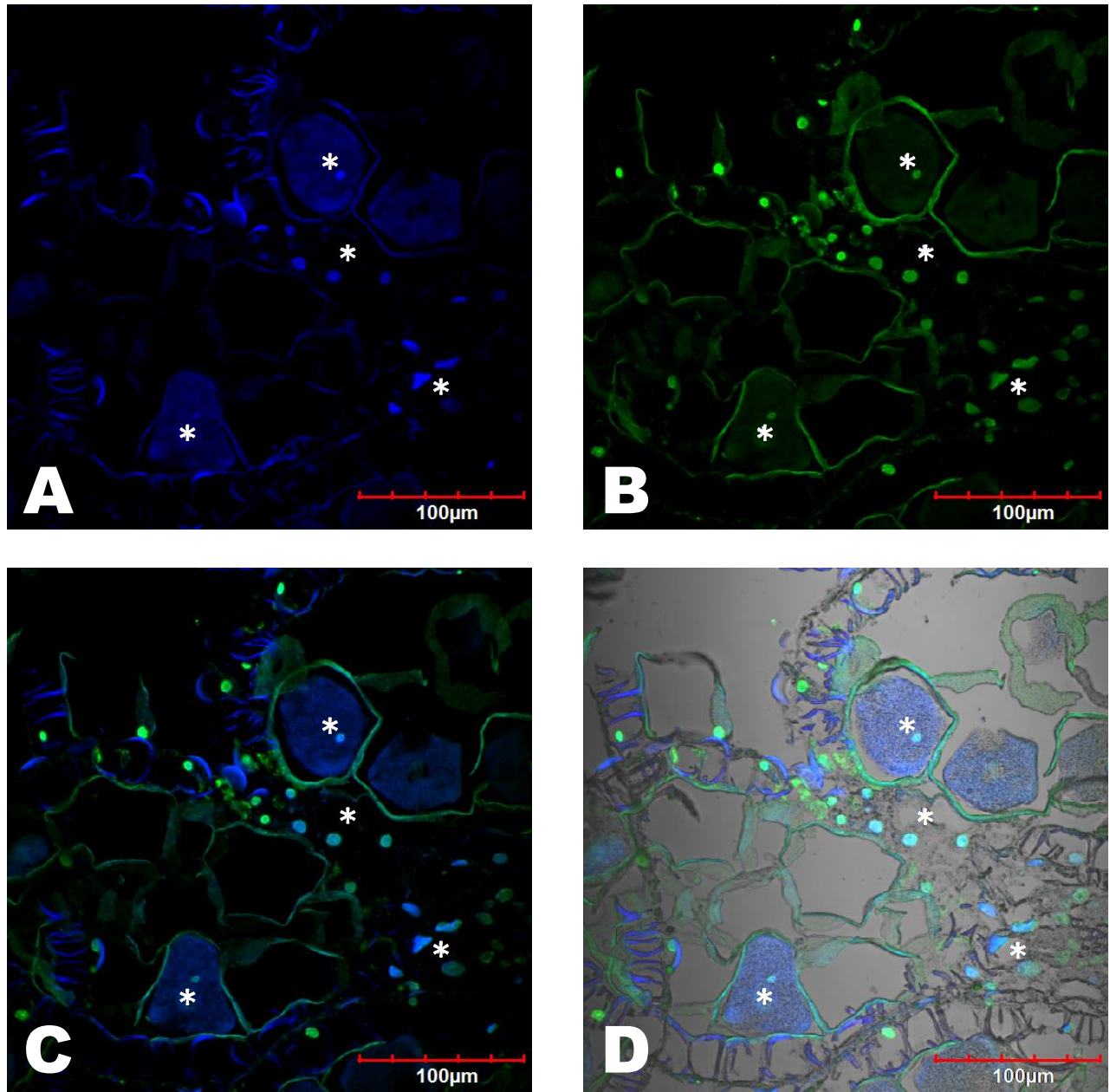
**A.** Observación para DAPI, los núcleos se tiñen en azul. Engrosamientos del endotecio y pared de los granos de polen es autofluorescencia.

**B.** Observación para TUNEL. Sólo la pared de los granos de polen es autofluorescente, pero los núcleos no se marcan.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones.

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.





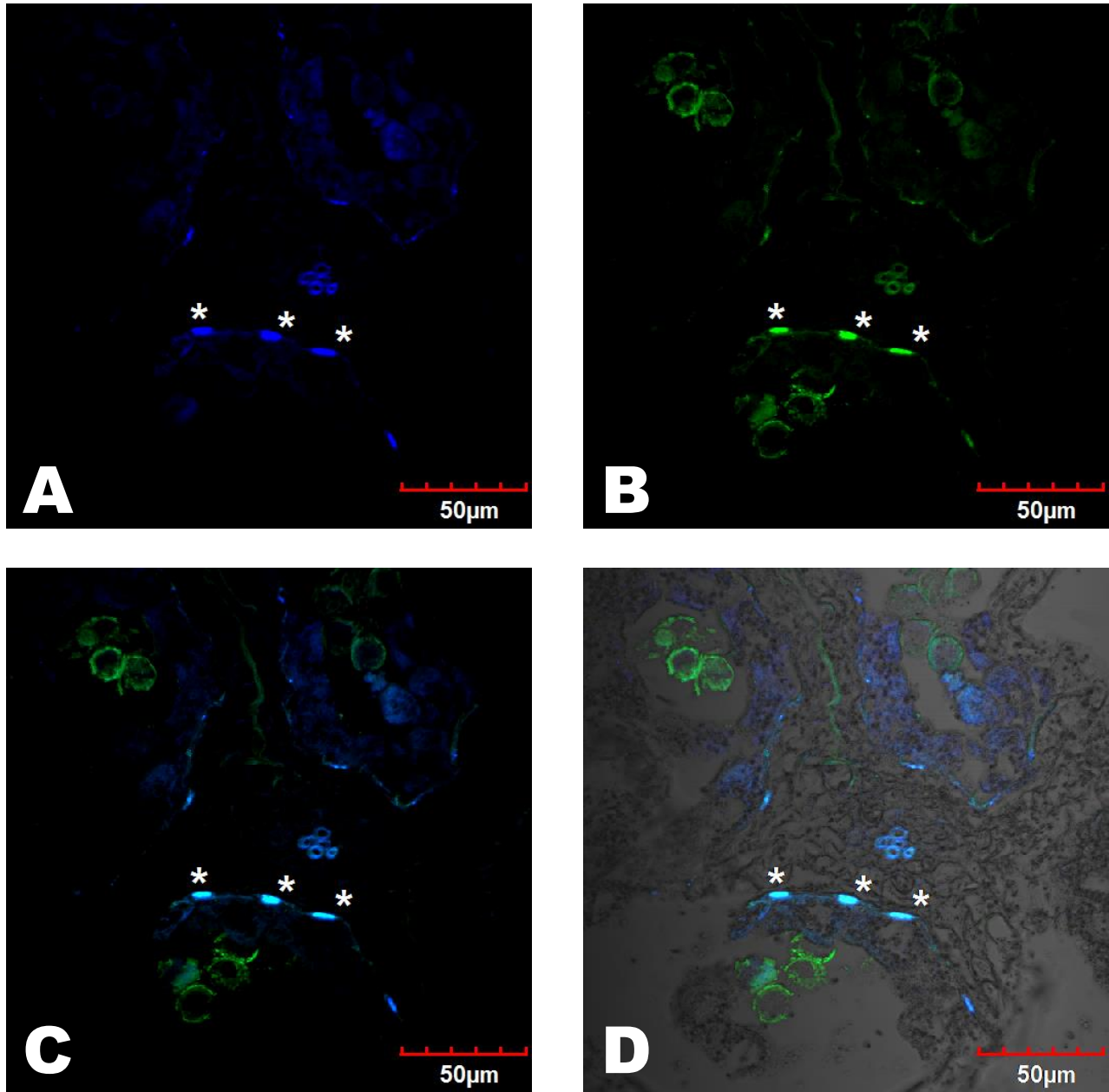
**Fig. 18. Control positivo (se adiciona DNasa y enzima TDT). Corte transversal de microsporangio de flor hermafrodita de *Pachycereus pringlei*.**

**A.** Observación para DAPI, los núcleos de los granos de polen y la pared de antera se tiñen en azul.

**B.** Observación para TUNEL. Los núcleos de la pared de antera y grano de polen dan positivo a degradación de ADN. La pared del grano autofluoresce.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. Los asteriscos señalan regiones con signos positivos de fragmentación

**D.** Sobrelapamiento y campo claro. Misma simbología



**Fig. 19. Control positivo (se adiciona DNasa y enzima TDT) Corte transversal de microsporangio de flor femenina de *Pachycereus pringlei*.**

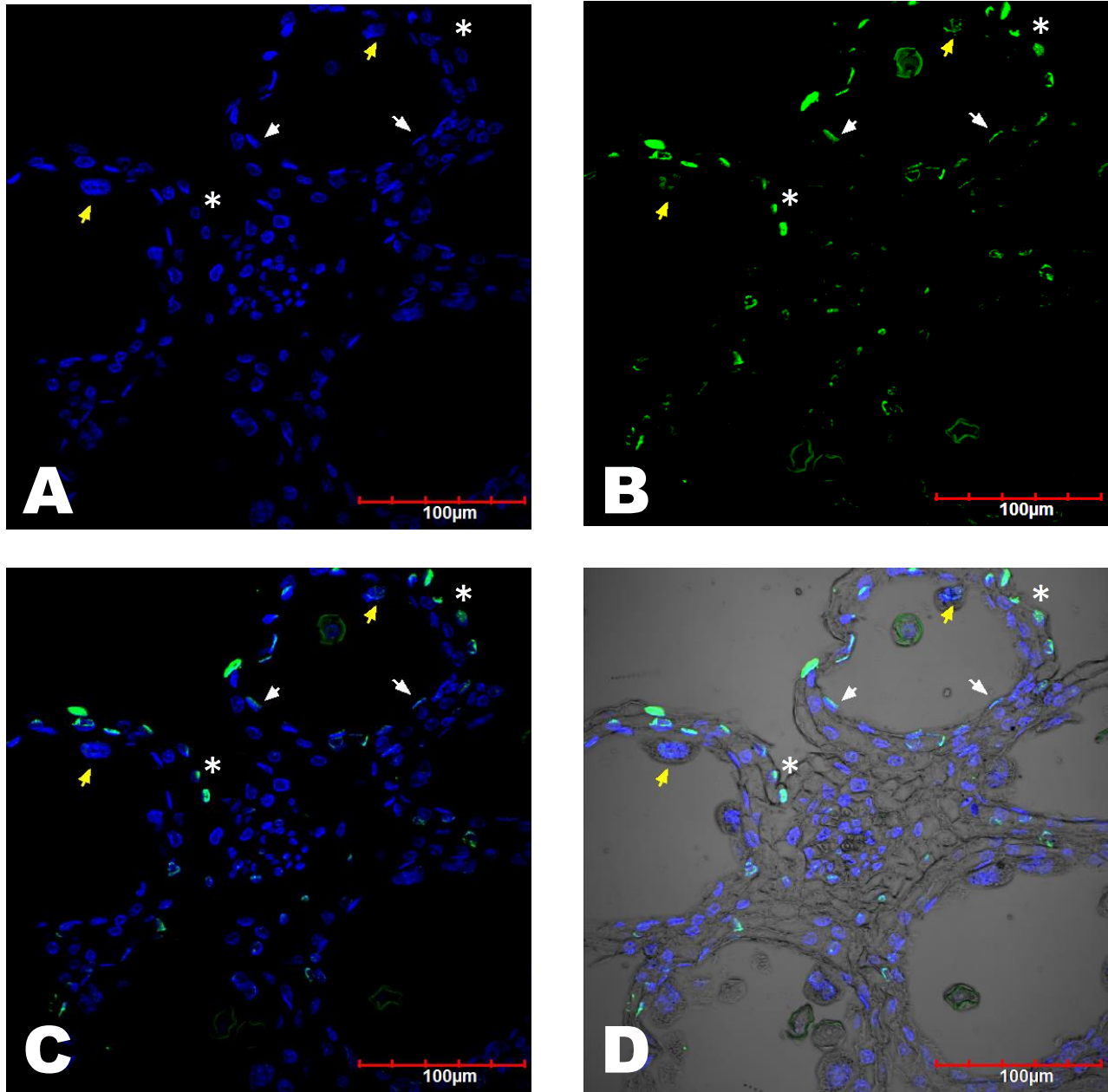
**A.** Observación para DAPI, los núcleos la pared de antera se tiñen en azul. Autofluorescencia de la pared de los granos de polen y del haz vascular.

**B.** Observación para TUNEL. Los núcleos del tapete se tiñen. La pared del grano y haz vascular autofluorescen.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. Asteriscos señalan signos positivos de fragmentación

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.





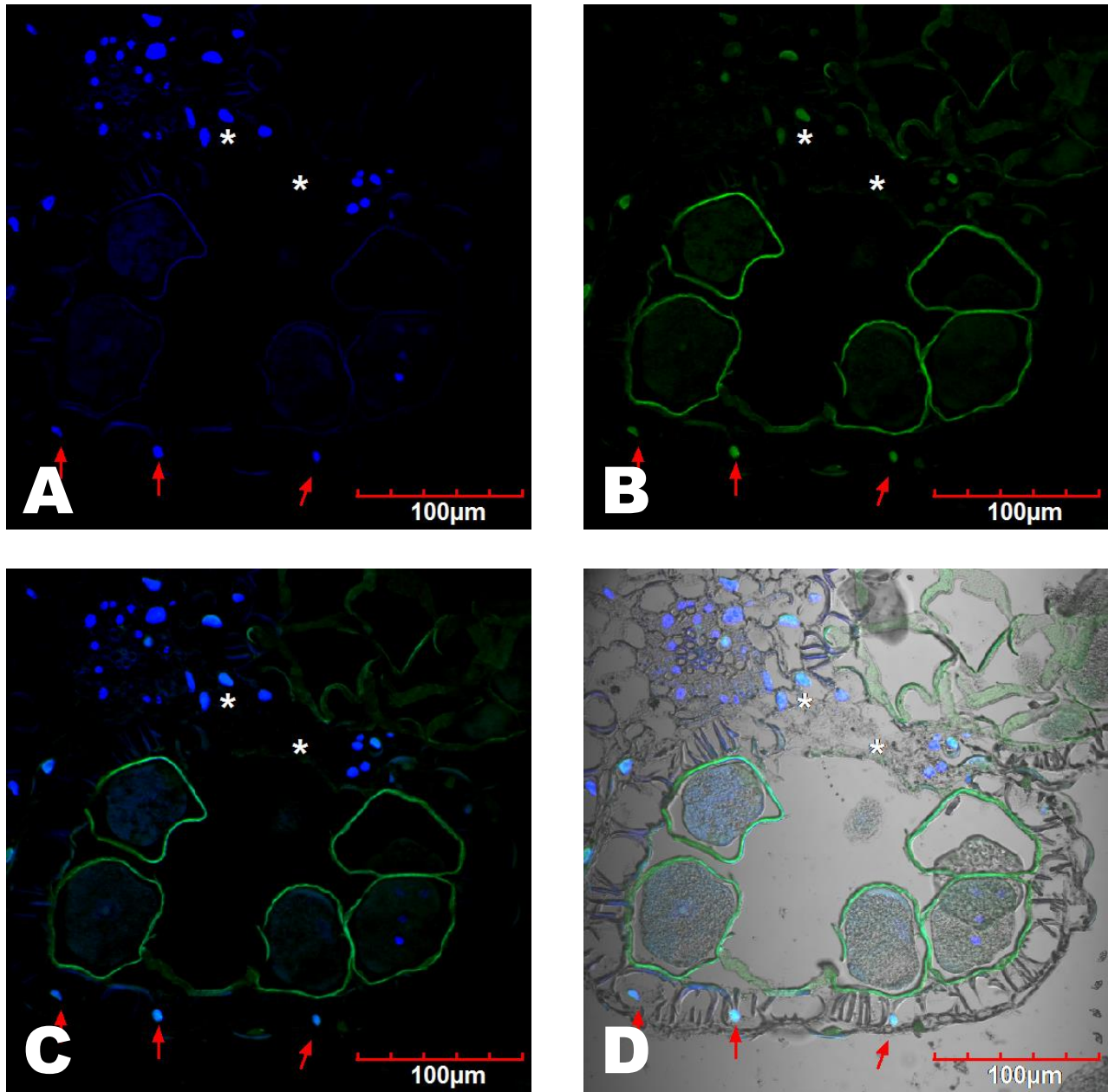
**Fig. 20. Corte transversal de microsporangio de flor hermafrodita de *Pachycereus pringlei* en etapa de microsporas libres.**

**A.** Observación para DAPI, exclusivamente los núcleos se tiñen en azul.

**B.** Observación para TUNEL. Varios núcleos se tiñen y la pared de la microspora autofluorece.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. Flechas blancas indican signos positivos de fragmentación de ADN en la capa media. Flechas amarillas el tapete. Asterisco indica signos positivos para la epidermis.

**D.** Sobrelapamiento y campo claro. Misma simbología.



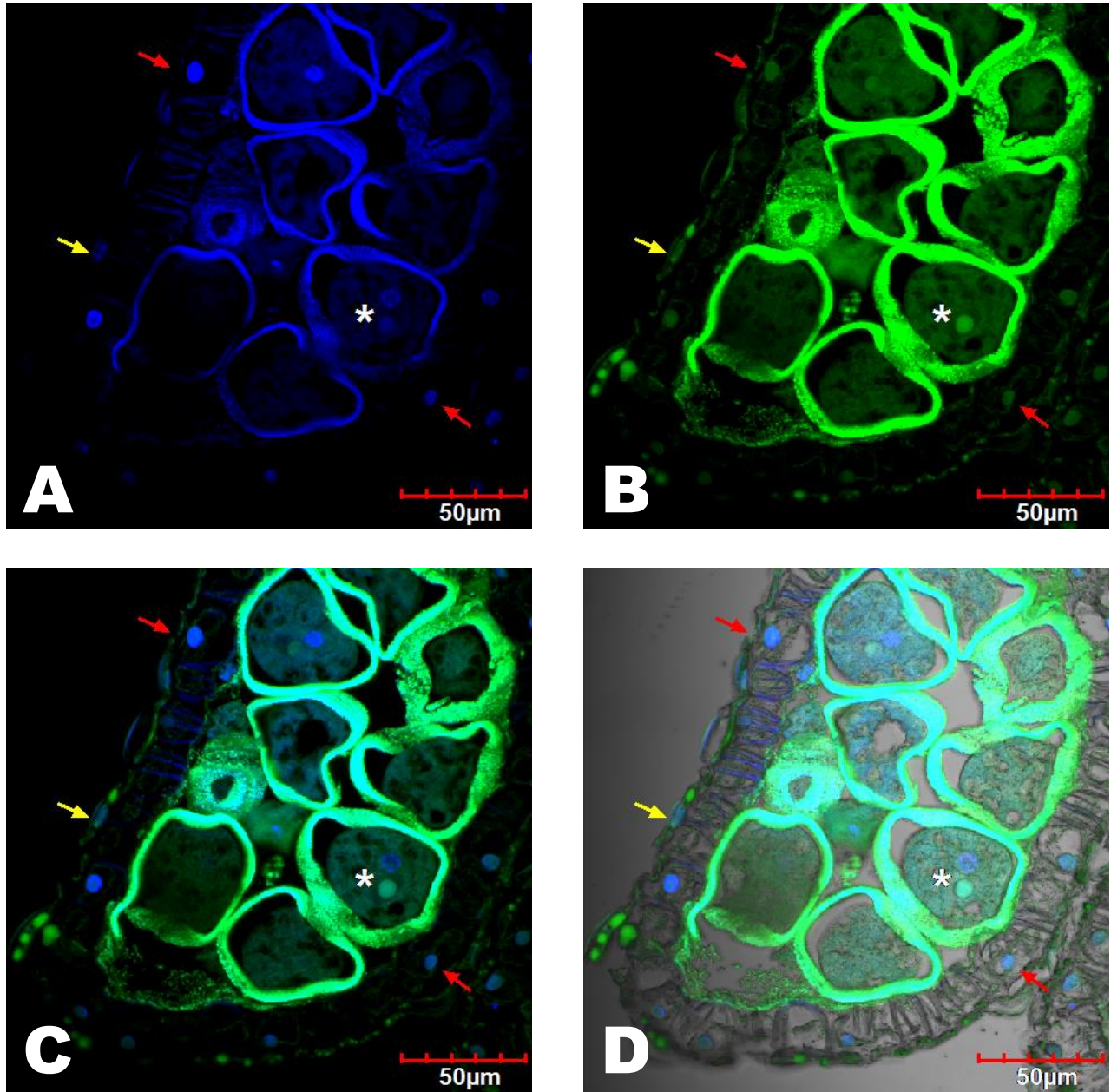
**Fig. 21. Corte transversal de microsporangio de flor hermafrodita de *Pachycereus pringlei* cercano a la antesis.**

**A.** Observación para DAPI, los núcleos se tiñen en azul.

**B.** Observación para TUNEL. La pared de los granos de polen es autofluorescente.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. Se presentan signos positivos de fragmentación en las células del endotecio (flechas rojas), así como la región del estomio (asteriscos blancos).

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.



**Fig. 22. Corte transversal de microsporangio de flor hermafrodita de *Pachycereus pringlei* cercano a la antesis con granos de polen anormales.**

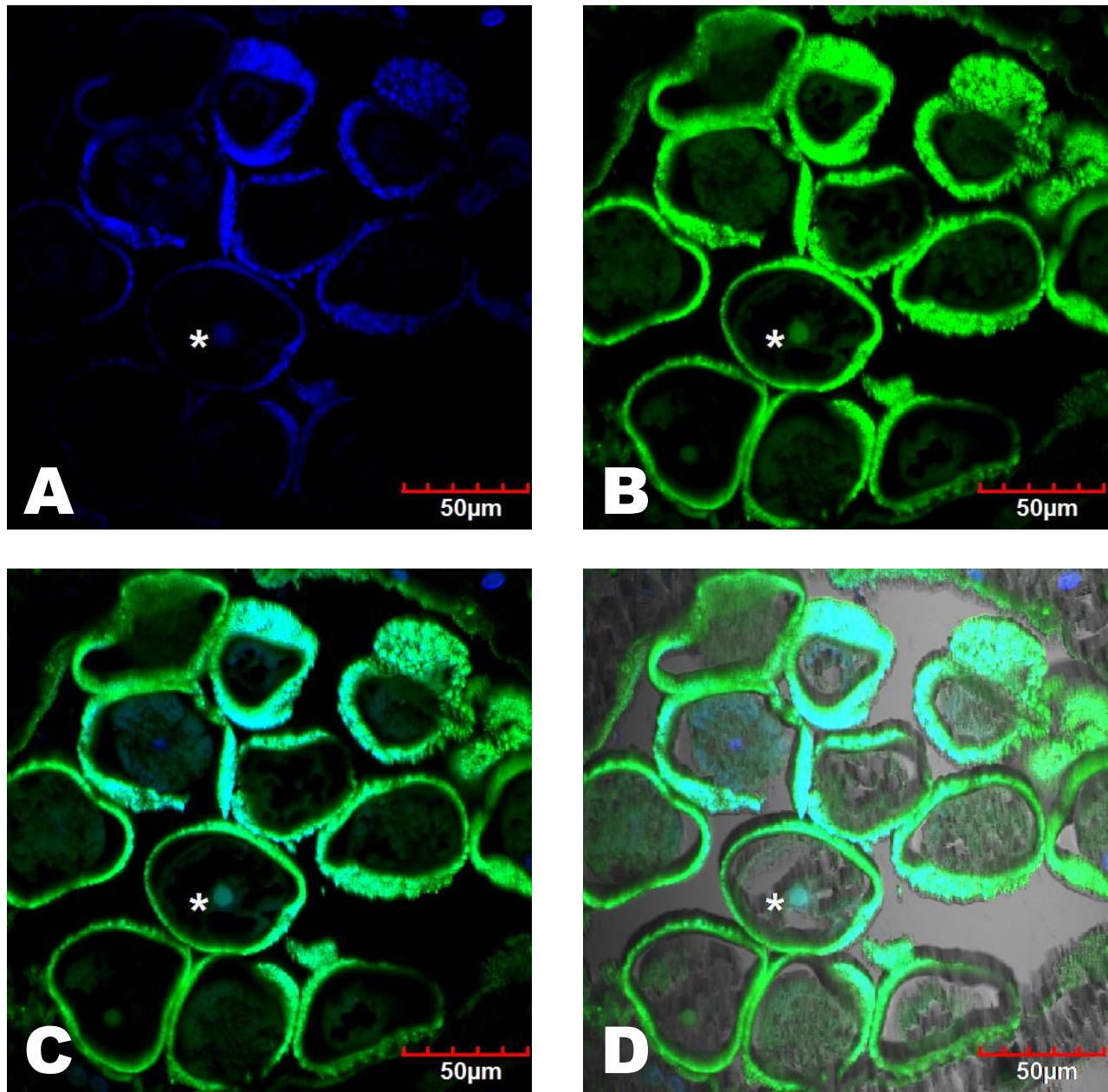
**A.** Observación para DAPI, los núcleos se tiñen en azul.

**B.** Observación para TUNEL. La pared de los granos de polen es autofluorescente.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. Se presentan signos positivos de fragmentación en células del endotecio (flechas rojas), así como la epidermis (flecha amarilla) y algunos granos de polen (asterisco blanco).

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.





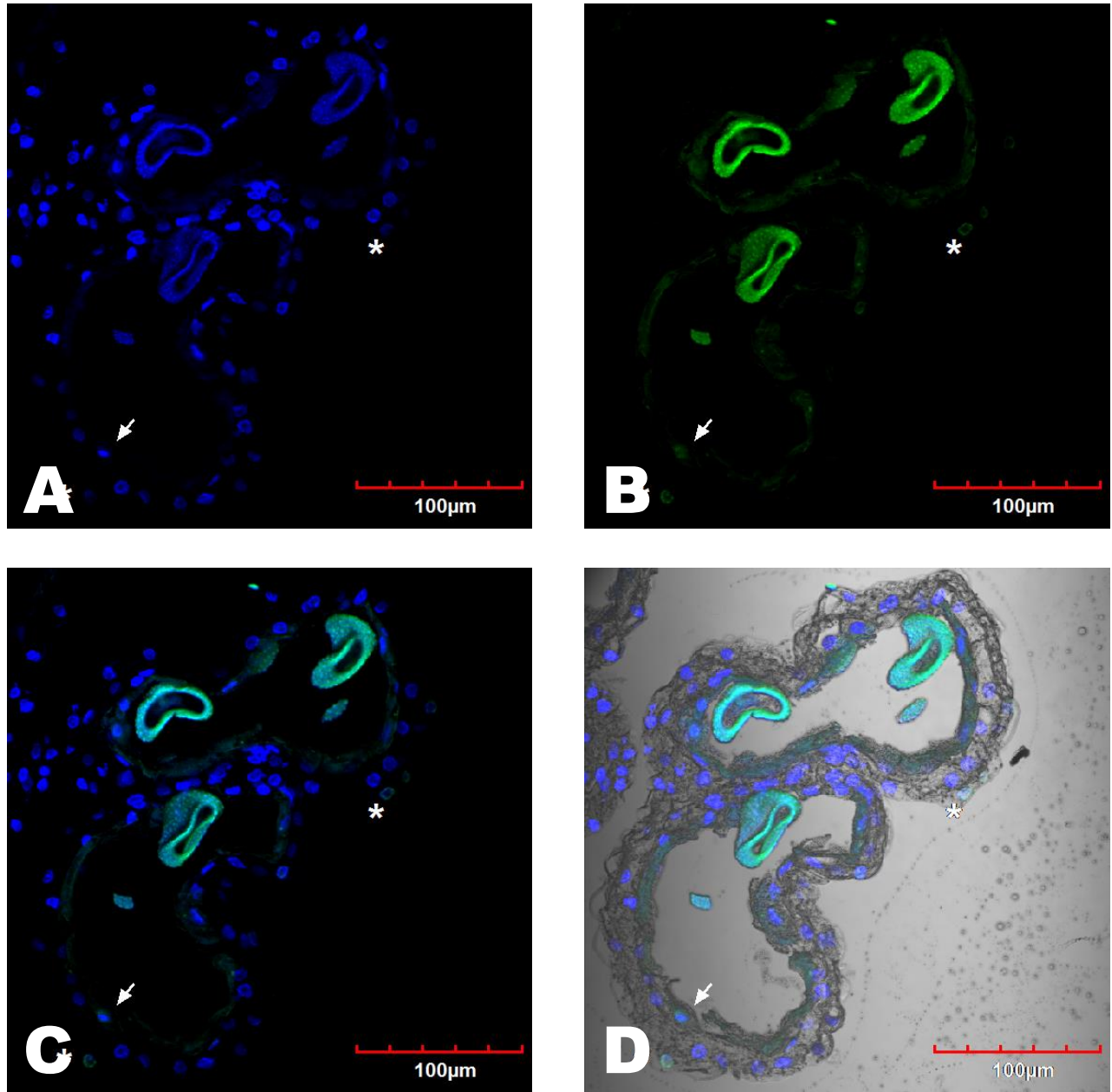
**Fig. 23. Corte transversal de microsporangio de flor hermafrodita de *Pachycereus pringlei* cercano a la antesis con granos de polen irregulares.**

**A.** Observación para DAPI, la pared de los granos de polen es autofluorescente.

**B.** Observación para TUNEL. La pared de los granos de polen es autofluorescente.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. Se presentan signos positivos de fragmentación en un grano de polen (asterisco blanco).

**D.** Sobrelapamiento v campo claro.



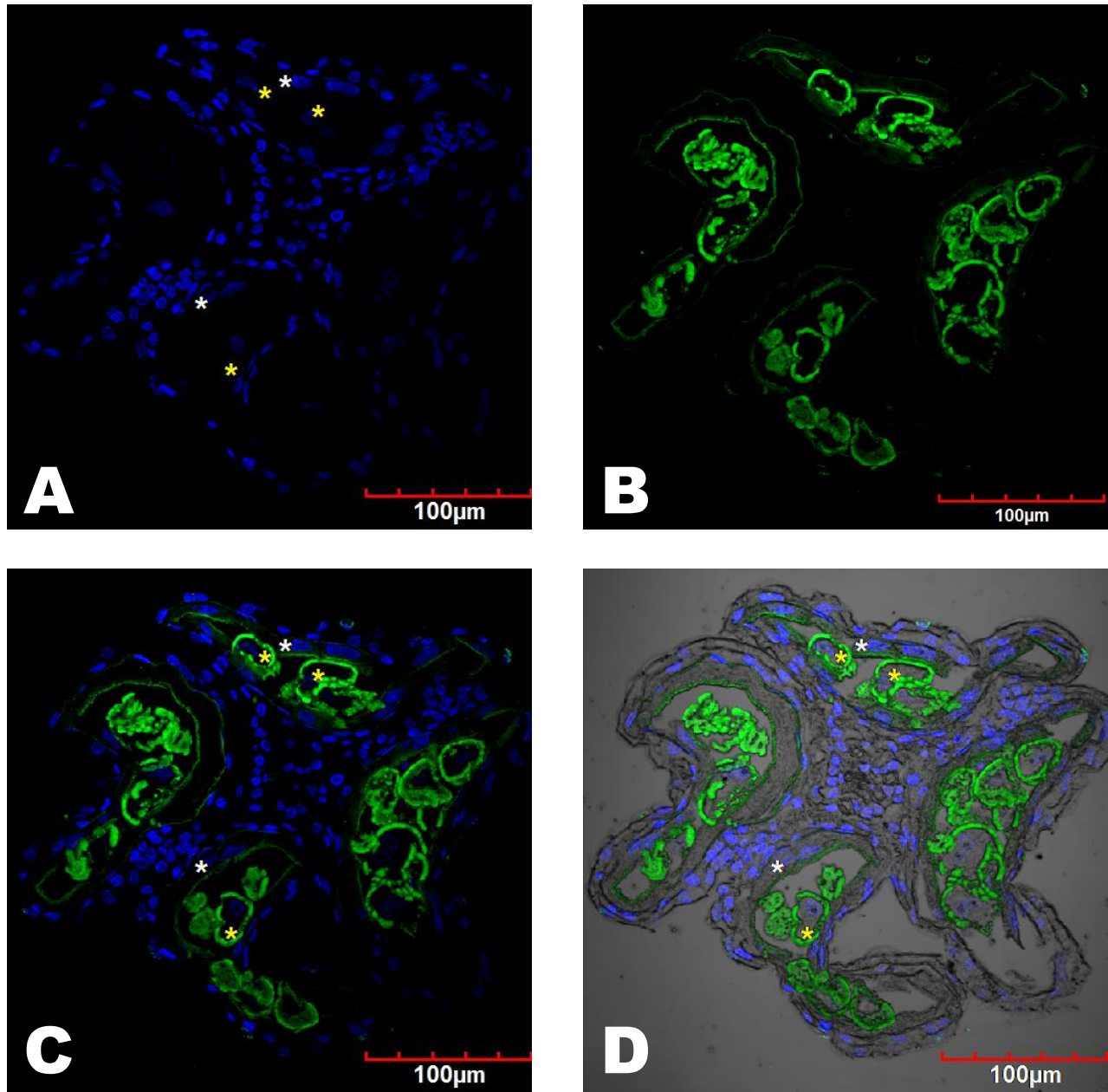
**Fig. 24. Corte transversal de microsporangio de flor masculina de *Pachycereus pringlei* en etapa de grano de polen.**

**A.** Observación para DAPI, exclusivamente los núcleos se tiñen en azul.

**B.** Observación para TUNEL. La pared irregular del grano de polen autofluoresce

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. Flecha blanca indica signos positivos de fragmentación de ADN en el tapete. El asterisco indica signos positivos para la epidermis.

**D.** Sobrelapamiento y campo claro. Misma simbología.



**Fig. 26. Corte transversal de microsporangio de flor femenina de *Pachycereus pringlei* en etapa de grano de polen joven.**

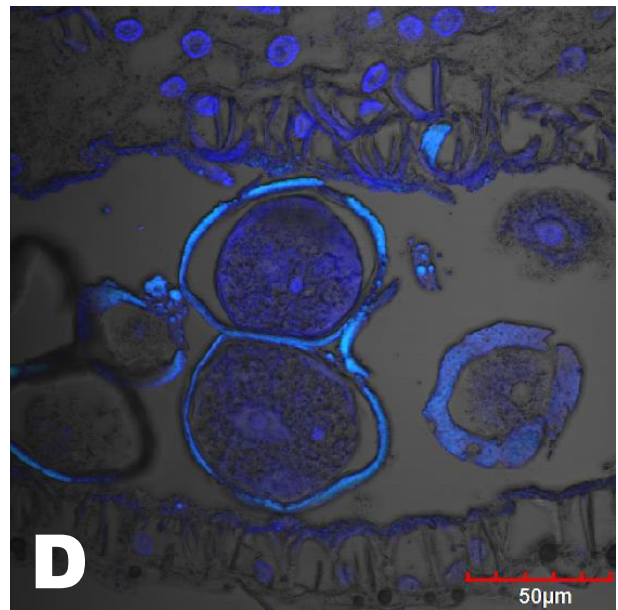
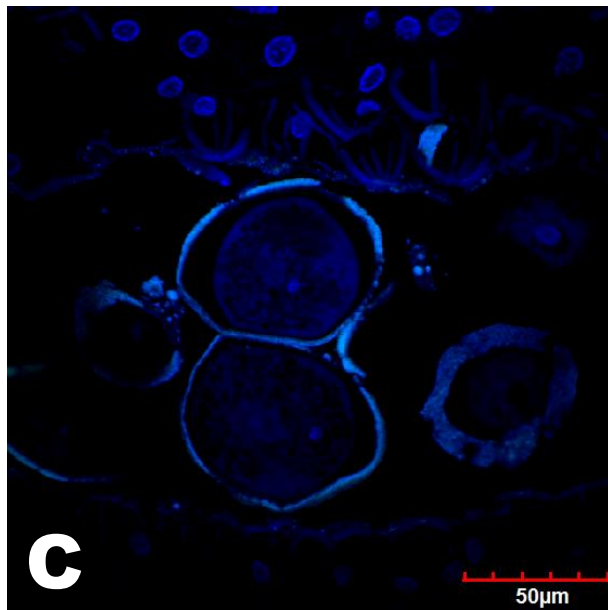
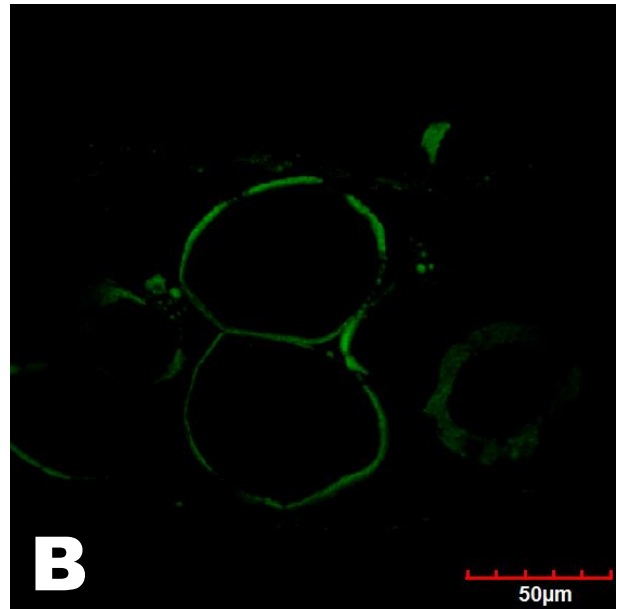
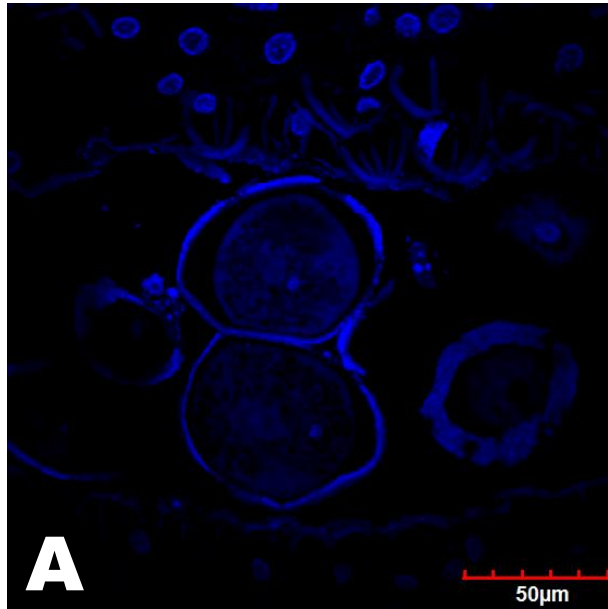
**A.** Observación para DAPI, exclusivamente los núcleos se tiñen en azul. Núcleos del tapete se señalan con asterisco blanco y núcleos de los granos de polen con asterisco amarillo.

**B.** Observación para TUNEL. Ningún núcleo se tiñen. La pared de los granos de polen autofluorescen así como las secreciones en el contorno de la pared del tapete.

**C.** Sobrelapamiento de **A** y **B**. Los núcleos de los granos de polen y del tapete no presentan signos de fragmentación.

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.





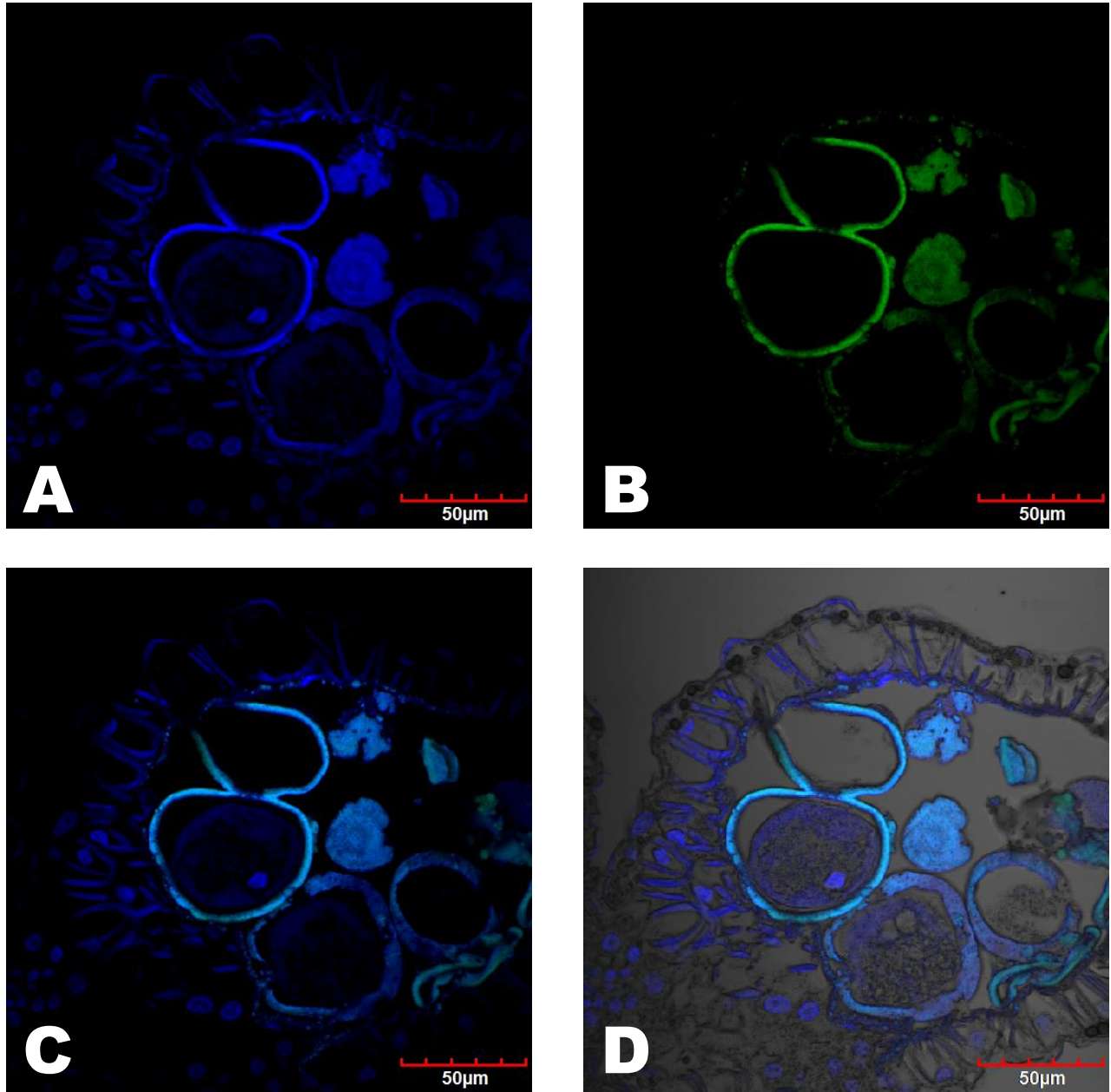
**Fig. 27** Corte transversal de microsporangio de flor femenina de *Pachycereus pringlei* cercano a la antesis.

**A.** Observación para DAPI, los núcleos de la pared de antera y del grano de polen se tiñen en azul.

**B.** Observación para TUNEL. La pared de los granos de polen es autofluorescente.

**C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. No se presentan signos positivos de fragmentación.

**D.** Sobrelapamiento y campo claro.



**Fig. 28. Corte transversal de microsporangio de flor femenina de *Pachycereus pringlei* cercano a la antesis.**

- A.** Observación para DAPI, los núcleos de la pared de antera y del grano de polen se tiñen en azul.
- B.** Observación para TUNEL. La pared de los granos de polen es autofluorescente.
- C.** Sobrelapamiento de las dos observaciones. No se presentan signos positivos de fragmentación.
- D.** Sobrelapamiento y campo claro.



## DISCUSIÓN

### Conformación poblacional

Fleming *et al.* (1998) describen las conformaciones poblacionales de *P. pringlei* en distintos sitios de la península de Baja California. A pesar de que los sitios de estudio no se encuentran georreferenciados de manera precisa, señalan como referencia la localidad de Guerrero Negro y Cataviña. En Guerrero Negro, el sistema sexual se describe como trioico (n= 25) y en Cataviña como ginodioico (n=34).

Por su parte, Medel (2008) realizó el estudio de una población a aproximadamente 86 km del sitio de colecta de Guerrero Negro, y encontró un sistema trioico en la localidad reportada como San Francisco (Fig. 3, San Francisco), con porcentajes similares de individuos entre los tres morfos (n=95). La georreferencia de la población que estudió en Cataviña (Fig. 3, Cataviña), se encuentra a 14 km de la localidad aquí estudiada. Reporta a la población como trioica, aun cuando sólo encontró una planta masculina en esta población, y cerca de 50 femeninas y 50 hermafroditas

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede sugerir que la población de Guerrero Negro presenta un sistema subdioico y la población de Cataviña se corrobora como ginodioica, sin embargo el muestreo es demasiado limitado para poder hacer una inferencia precisa de la estructura poblacional.

Tanto Fleming *et al.* (1998) como Medel (2008), determinaron la sexualidad de cada individuo por las observaciones realizadas en campo de sólo una flor en anthesis. Trabajos posteriores en esta especie que pretendan evaluar su sexualidad, deben revisar al menos tres flores por individuo y de ser posible hacer preparaciones en fresco y observaciones con microscopio óptico, con la finalidad de hacer descripciones y observaciones detalladas de los granos de polen.

La información recabada en estos estudios y el presente es consistente entre sí. Cerca de Guerrero Negro se pueden encontrar los tres sexos, pero este estudio opta por caracterizar el sistema como subdioico (este aspecto se profundizará más adelante). Por otro lado, dada la proporción que encuentra Medel (2008) en la localidad de Cataviña el sistema debe ser descrito como ginodioico.

La definición de un sistema trioico es ambigua (presencia de individuos femeninos, hermafroditas y masculinos en proporciones relativamente altas) y para caracterizar los sistemas sexuales de una población se requiere que la sexualidad de los individuos sea clasificada como variables discretas, cuando en realidad son variables continuas. Por lo tanto, considero que la discrepancia en la caracterización de los sistemas sexuales se trata de un problema metabiológico.

### **Gineceo**

El desarrollo de los óvulos en los individuos femeninos y hermafroditas es el mismo que el descrito por Núñez (2004) para esta especie. De los morfos masculinos sólo se encontraron flores con óvulos anómalos y funículos con proyecciones nucelares que no forman tegumentos. No se encontraron flores maduras masculinas como las reportadas por Núñez (2004), las cuales exclusivamente desarrollan funículos, tampoco aquellas flores neutras reportadas por Fleming *et al.* (1994).

Algunos óvulos del morfo masculino formaron un tegumento externo que no llegaba a cubrir al tegumento interno por completo, siendo el tegumento interno, el que cubre completamente a la nucela y forma el micrópilo. Algunos de esos óvulos llegan a tener una forma curva, pero su apariencia es diferente por observarse más delgados que los óvulos del morfo femenino. Todos los óvulos de las flores masculinas analizadas presentaron un tegumento interno

cubriendo completamente a la nucela y no se encontraron aquellos que presentasen una nucela expuesta. En el caso de Cataviña todos los hermafroditas presentaban óvulos normales. Medel (2003) señala la existencia de un morfo hermafrodita con esterilidad parcial femenina, el cual tiene una menor cantidad de óvulos que los morfos femeninos y cuyo desarrollo es similar al masculino. La información que presenta este autor sobre estos óvulos es escasa y las preparaciones histológicas así como las micrografías presentadas son de pobre calidad. El autor señala que es conveniente considerar a estos individuos como masculinos en trabajos futuros con esta especie, lo cual se discutirá más adelante.

Por su parte Núñez (2004) encuentra que en estos óvulos deformes es posible encontrar sacos embrionarios similares a los desarrollados por los morfos hermafrodita y femenino, lo cual es confirmado por el presente trabajo. Además señala que muchos ovarios producen frutos abortivos, pero algunos frutos pueden estar repletos de semillas que presentan testas irregulares y desarrollan embriones con curvaturas diferentes a las normales. Por esta condición irregular en la semilla la autora considera a estas plantas como masculinas.

Una apreciación personal acerca del desarrollo anómalo del óvulo del morfo masculino es que éste lleva a cabo una diferenciación retrasada temporalmente con respecto a los morfos funcionales (femeninos y hermafroditas). En estos dos se encontró que en botones de gran tamaño, éstos ya habían formado el saco embrionario, sin embargo, las formas masculinas se encontraron apenas en fase de célula madre de la megaspóra, pero en flores que empezaban a marchitarse se encontraron sacos embrionarios.

En seis especies del género *Consolea* se ha descrito que las formas masculinas presentan un desarrollo heterocrónico en los óvulos, lo cual conlleva a la esterilidad parcial o total del gineceo. Pero a diferencia de lo observado en *P. pringlei*, las especies de *Consolea*

presentan un desarrollo adelantado de óvulos, y al momento de la antesis ya se encuentran senescentes (Strittmatter *et al.*, 2008).

La información presentada de la anatomía del estilo y estigma es nueva para *P. pringlei* y no se encontró ninguna diferencia evidente entre el desarrollo de los distintos morfos.

Por lo general las células del mucílago en los estilos son más abundantes en la parte apical que en la basal en donde llegan a estar ausentes. En el caso de los lóbulos estigmáticos, el número es constante en los tres morfos, presentándose de seis a ocho lóbulos por estigma. En algunas cactáceas con flores unisexuales el desarrollo de los estilos presenta variación entre los distintos sexos. Por ejemplo de la subfamilia Opuntioideae, *Opuntia stenopetala* es una especie dioica y durante el desarrollo de las flores masculinas los carpelos forman un ovario y un estilo reducido y carecen de estigma bien definido. La anatomía de las flores femeninas y masculinas es diferente, principalmente en el arreglo del tejido de transmisión, en la apariencia y disposición de las células de mucílago y en la forma de las células que componen el canal estilar (Orozco *et al.*, 2012). Hernández (2008) observó que entre los dos tipos florales de una población dioica de *Opuntia robusta*, existe un dimorfismo en el pistilo. El estigma se encuentra ligeramente reducido en el morfo masculino, además la cantidad de papilas estigmáticas es menor y los lóbulos son diferentes. Además el ovario presenta pocos óvulos, los cuales no se encuentran completamente desarrollados y el tejido de transmisión presenta algunas diferencias morfológicas importantes.

En el caso de la subfamilia Pereskioideae, Camacho (2008) reporta que *Pereskia portulacifolia* presenta flores masculinas con un gineceo reducido, el ovario es ínfero con piso cóncavo y carece de óvulos; el estilo está reducido y presenta bifurcaciones que forman de seis a ocho lóbulos estigmoides, carentes de papilas. También menciona que las células del tejido

placentario se van colapsando conforme avanza el desarrollo del gineceo, y señala como probable que se deba a un proceso de MCP.

De la tribu Cacteeae *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* presentan flores funcionalmente masculinas con gineceo aparentemente bien desarrollado. En *E. polyacanthus* se registró adherencia de polen a los lóbulos estigmáticos y crecimiento de tubos polínicos los cuales no llegaron hasta la base del estilo. Por su parte, *E. coccineus* presenta estilos funcionales, por los que crecen los tubos polínicos, e inclusive se lleva cabo la fecundación, pero las flores masculinas no desarrollan frutos. La autora propone dos opciones para la interpretación de este fenómeno en *E. coccineus*; que la aborción de las semillas se da posfecundación, o bien que la población estudiada es subdioica (Hernández, 2011).

### **Androceo**

Se encontraron diversas irregularidades en el desarrollo del androceo de todos los morfos de las dos poblaciones las cuales se resumen en la Tabla 3. En un mismo individuo (hermafrodita o masculino) se presentaron algunas flores con irregularidades en la formación del grano de polen, mientras que en otras flores del mismo individuo se presentaba un desarrollo normal, lo cual nunca había sido reportado en esta especie. La irregularidad más común entre estos dos morfos fue el desarrollo de granos de polen con forma anormal, sin plegamientos en las aberturas. En algunos cortes histológicos, estos granos de polen llegaban a presentar el citoplasma degenerando. En la familia Asteraceae, se han documentado algunos mutantes de *Tagetes patula* que pueden llegar a desarrollar granos de polen de formas irregulares que asemejan a las presentadas en este trabajo para los morfos masculinos y hermafroditas, y también algunos granos de polen presentan una exina sin ornamentación tal y como lo presentan algunos individuos femeninos de *P. pringlei*. Estos mutantes se obtuvieron

mediante un cultivo a altas temperaturas (45 °C en el día y 35 °C por la noche). En todos los casos los granos de polen formados con irregularidades son completamente estériles y los autores asocian esta esterilidad masculina a la muerte prematura del tapete periplasmoidal (Ai *et al.*, 2014).

Previo al presente trabajo, no se había realizado una descripción detallada de los granos de polen que presenta *P. pringlei* y por lo tanto no existe información para evaluar la funcionalidad de estos particulares tipos de granos de polen. Fleming *et al.* (1994) reportan que la efectividad del polen para formar frutos es casi la misma entre polen de morfos hermafroditas y masculinos cuando la planta que fructifica es femenina. Por su parte las plantas hermafroditas forman más frutos cuando reciben polen de otras hermafroditas que de plantas masculinas, sin embargo, la producción de semillas por fruto siempre fue menor en el morfo hermafrodita. Dado que en ese experimento se ocuparon cuatro flores como donadoras de polen, el tamaño de esta muestra es pequeño, por lo que considero probable que los resultados puedan estar relacionados con las irregularidades observadas en este trabajo, ya que cabe la posibilidad que la menor fructificación de las hermafroditas se deba a que recibieron polen anómalo. Esto es muy especulativo, ya que algunos estigmas observados en microscopía electrónica de barrido revelaron estar repletos de granos de polen anormal. Una hipótesis es que la forma irregular se debe a que el grano ya formó el tubo polínico, pero los cortes histológicos del estigma presentaron granos de polen con forma irregular y citoplasma en su interior. Estas observaciones permiten pensar que la irregularidad se encuentra presente antes de la liberación del grano de polen, y que al parecer esta irregularidad no interfiere en la adherencia del grano de polen. Por otro lado, algunos granos de polen irregulares de flores hermafroditas presentaron fragmentación de ADN, lo que sugiere que



algunos de estos granos no son viables, y probablemente se trate de una esterilidad masculina parcial en el morfo hermafrodita. Los resultados no sugieren una esterilidad total de este verticilo debido a que no todos los núcleos de los granos de polen se observan con fragmentación de ADN. Se tienen reportes que algunos autotetraploides de arroz, pueden presentar irregularidades en los granos de polen, tales como la formación de dos nucléolos, granos multiaberturados, o con el citoplasma colapsado, granos de polen amorfos y degeneración de algunas microsporas (Wu *et al.*, 2014). Un efecto similar podría estar ocurriendo en el morfo hermafrodita de *P. pringlei*.

Sanders *et al.* (1999) describen el desarrollo de algunos granos de polen irregulares producidos por mutantes de *Arabidopsis thaliana*, los cuales denominan *defective-pollen1*, *2* y *3*. Al momento de la antesis, el desarrollo de la pared de antera es similar a la línea silvestre, sin embargo algunos granos de polen que se dispersan no contienen citoplasma y su forma es completamente anómala. En el artículo se señala que *defective-pollen3* es el mismo mutante que el descrito por He *et al.* (1996) como *mei-1*, lamentablemente no presentan imágenes de los otros dos mutantes para poder compáralos con los de *P. pringlei*.

Una planta hermafrodita de la localidad de Cataviña presentó un desarrollo del androceo muy particular. La mayoría de las anteras desarrollaron granos de polen de mayor tamaño, con una exina de menor espesor y tricelulares. En esta planta se encontraron algunos botones con anteras formando granos de polen jóvenes con formas sumamente irregulares, así como anteras indehiscentes que no desarrollaban polen. Estos granos de polen en caso de llegar al estigma, pueden germinar y la velocidad de crecimiento del tubo polínico puede ser mayor por almacenar mayor cantidad de nutrientes. Si bien la exina adelgazada podría favorecer una

rápida deshidratación del grano de polen, se debe de considerar que la antesis de esta especie es nocturna, lo cual disminuiría estas posibilidades.

Sanders *et al.* (1999) describen una serie de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que no desarrollan granos de polen en sus lóculos (*pollenless1-1,1-2; pollenless2; pollenless3-1,3-2*) y en algunas ocasiones se encuentran remanentes de estas células en el lóculo, semejante a como se presenta en *P. pringlei*. Las células derivadas de las CMMi degeneran rápidamente y generalmente no llegan a la etapa de microsporas. En *pollenless1-1* y *pollenless2* la muerte de tapete se da de manera prematura. En *pollenless1-1* y *pollenless3-2* no existe desintegración del estomio ni del septo. Esta última característica se puede observar de igual manera en *P. pringlei*.

### **Androceo de flores femeninas**

La primera anomalía que se observa en el desarrollo del androceo de las flores femeninas es la deposición irregular de calosa en las células madres de las microsporas. En la fase de tétradas se demuestra que éstas exhiben una forma sumamente irregular, y observaciones al microscopio confocal demuestran presentan más de cuatro núcleos. Al liberarse las microsporas de la tétrada presentan una pared irregular, probablemente de calosa. Resultados similares son reportados para el mutante *mei-1* de *Arabidopsis thaliana*, el cual desarrolla tétradas con cinco y hasta ocho células, las cuales presentan núcleos de diversos tamaños (He *et al.*, 1996). De igual manera en un poliploide del tabaco se ha registrado que la fase de tétradas pueden dar por resultado unas células irregulares sin lograr dividirse de manera exitosa. Se detectan varios núcleos dentro de estas poliadas (Sidorchuk y Deineko, 2014).

La fase de tétradas no es reportada por Núñez (2004) en la población de Bahía Kino, pero señala que los granos de polen desarrollan paredes muy gruesas e irregulares y que éstos pierden su citoplasma. En algunas anteras reporta un tapete intrusivo, lo cual no se observó en ninguna preparación en este trabajo. La autora señala que en una etapa madura de las anteras es posible encontrar también granos de polen jóvenes, con exina irregular, los cuales se conservan uninucleados. Los mismos resultados se encontraron en este trabajo. En ninguna muestra los granos de polen se observaron en fase bicelular. Inclusive en algunas muestras acetolisadas, estos granos no liberaban el citoplasma por completo, y llegaban a conservar el núcleo.

Es probable que la esterilidad femenina en *P. pringlei* se relacione con las microsporas y con el tapete (de este último se profundizará en el apartado de MCP). La condición poliploide de *P. pringlei* (Pinkava *et al.*, 1973; Murawski *et al.*, 1994) puede relacionarse con estas anomalías, ya que se ha demostrado que especie poliploides presentan diversos problemas al momento de llevar a cabo la meiosis, principalmente por una repartición inadecuada del material genético (Grandont *et al.*, 2013; Sidorchuk y Deineko, 2014; Wu *et al.*, 2014). Además, como propone Núñez, (2004), una excesiva síntesis de esporopolenina puede estar llevando a una menor cantidad de nutrimentos disponibles para el desarrollo de los granos de polen.

### **El grano de polen**

Las características de asociación, polaridad, simetría y forma del grano de polen, así como el número de aberturas y características de la exina son consistentes con la generalidad en los granos de polen de cactáceas (Kurtz, 1963; Erdtman, 1966; Anderson, 2001). A diferencia de

*Pachycereus weberi* (Aguilar-García *et al.*, 2012) en *P. pringlei* no se observaron variaciones tan pronunciadas en el tamaño de los granos de polen.

Por otro lado, la gran mayoría de los granos de polen del morfo femenino pierden el citoplasma, pero aquellos que lo conservan, parecen completamente inviables, debido a que la gruesa pared de exina y no permite la salida del citoplasma.

### **Muerte celular programada en *Pachycereus pringlei***

*Pachycereus pringlei* presenta un patrón similar de MCP en el desarrollo del androceo funcional de los individuos hermafroditas y masculinos. Durante el desarrollo normal, una vez que se ha liberado la tétrada de microsporas, la capa media, así como el tapete inician en un proceso de MCP. Esto es concordante con lo reportado por Papini *et al.* (1999) quienes señalan que las células del tapete de tipo secretor atraviesan por un proceso de MCP caracterizado por la condensación de la cromatina y su desplazamiento a la periferia del núcleo. Posteriormente las células tapetales pierden sus paredes y plasmodesmos, seguido de su colapso. Este paso es crucial para la liberación de nutrientes para el desarrollo correcto de las microsporas. De acuerdo al modelo propuesto por Varnier *et al.* (2005) para el género *Lilium*, la MCP se extiende de manera radial, iniciando por el tapete y la capa media, y seguido por el endotecio la epidermis y la región del estomio. Este proceso de MCP permite la dehiscencia de la antera y las alteraciones en este patrón pueden desencadenar en la esterilidad masculina. En *P. pringlei* se registró MCP en algunas células de la epidermis desde una fase de microsporas libres. Este resultado es inesperado, puesto que este estrato de la antera es persistente en las anteras durante la antesis. Probablemente esto se deba a alguna interacción con patógenos, herbívoros o bien por algún factor ambiental como la

radiación (Gadjev *et al.*, 2008). Cuando ya se ha formado el grano de polen se registra MCP en el endotecio y en la región del estomio, lo cual permite la liberación del grano de polen.

Las anteras de flores femeninas por su parte presentan una alteración en el proceso de MCP. El tapete presenta un retraso en la expresión de la MCP, respecto al desarrollo de granos de polen normales. Esta vida prolongada del tapete puede relacionarse con la sobreproducción de esporopolenina que se expresa en las anteras del morfo femenino. Eventualmente, en el desarrollo el tapete desaparece muy probablemente debido a un proceso de MCP. A pesar de que no se registró MCP en el endotecio y el septo, es muy probable que sí ocurra, ya que en diversos cortes de anteras maduras se observó que son dehiscentes por la región del estomio.

En algunas cactáceas que desarrollan flores con esterilidad masculina, se presenta una degeneración del androceo debido a un proceso de MCP en una fase temprana del desarrollo. El género *Consolea* presenta seis especies con una alteración en el proceso de MCP del tapete, en donde este tejido se hipertrofia, invade el lóculo, provocando la degeneración de las células madres de las microsporas. De igual manera, las células del tapete conservan sus paredes celulares, evitando la dehiscencia de la antera (Strittmatter *et al.*, 2006). En *Opuntia stenopetala* la disfuncionalidad del androceo de flores femeninas se presenta durante la etapa de células madres de las microsporas, las cuales inician un proceso de MCP, el cual detiene su desarrollo. Sincrónicamente el tapete inicia la MCP en una fase anterior a la que se presenta en el morfo masculino y en etapas avanzadas todos los estratos de la pared de antera registran actividad de MCP. Al momento de la antesis todo el verticilo floral masculino se encuentra completamente degenerado (Flores-Rentería *et al.*, 2013). La investigación de Hernández (2011) revela que la MCP está involucrada en la esterilidad de *Echinocereus*

*coccineous* y *E. polyacanthus*, ya que durante la etapa de células madres de las microsporas estas células y las del tapete comienzan con la degradación de su material genético, y durante la antesis se registra en todos los estratos de la antera, lo que ocasiona el colapso de estos órganos. Por su parte en *P. pringlei* se observan granos de polen anómalo del morfo hermafrodita con fragmentación de ADN en una etapa muy avanzada, cerca de la antesis. Este tipo de comportamiento no se ha reportado en la familia Cactaceae y es de interés para la discusión de los sistemas sexuales que presenta esta especie.

### **Los sistemas sexuales de *Pachycereus pringlei***

Diversos datos que se conocen de la expresión sexual de *P. pringlei* hacen pertinente cuestionar acerca de si esta especie expresa un sistema sexual verdaderamente trioico. Si bien diversas poblaciones de *P. pringlei* presentan individuos femeninos, masculinos, y hermafroditas en proporciones relativamente altas (Fleming *et al.*, 1994, 1998; Cervantes, 2001), la identificación del sexo de estas especies no es clara, por lo que de acuerdo con Ross (1982) se trataría de poblaciones subdioicas.

La funcionalidad del androceo en *P. pringlei* ha sido tratado de una manera binomial. Sin embargo en estudios futuros de esta especie deben tomarse en cuenta diversos aspectos del polen para evaluar de manera certera la funcionalidad de los morfos y poder describir de manera acertada su sistema sexual. Fleming *et al.* (1994) evalúan la producción de polen entre masculinos y hermafroditas y no encuentran diferencias significativas en la cantidad de polen producido por flor. Tampoco existe una diferencia en la producción de frutos en el individuo femenino si recibe polen del masculino o hermafrodita. Los hermafroditas producen menos frutos cuando reciben polen del morfo masculino que cuando recibe polen del hermafrodita, pero quizás alguna de las anomalías encontradas en el desarrollo del



androceo está relacionada con este particular resultado. Núñez (2004) se limita a señalar algunas características de los granos de polen, pero no evalúa su funcionalidad. Medel (2008) menciona (sin evidencia) que existen algunos hermafroditas con esterilidad parcial masculina, ya que “no pueden desarrollar suficientes granos de polen, o bien presentar deformaciones”, sin embargo, no menciona cómo categoriza a estos individuos y que tan frecuentes son en las poblaciones. El presente trabajo caracteriza deformidades en la formación de grano de polen tanto masculino como hermafrodita, así como una probable funcionalidad disminuida en el morfo hermafrodita debido a un proceso de MCP.

En Bahía Kino el gineceo de las plantas masculinas que describe Fleming *et al.* (1994) en algunas ocasiones forman óvulos, y también algunos llegan a formar frutos abortivos. Este grupo de investigadores reporta que excepcionalmente algunas plantas llegaron a formar frutos maduros pero con semillas inmaduras. Estos autores reportan que el gineceo de los morfos femeninos producen 1.62 veces más semillas que los hermafroditas con polinización abierta. En la misma localidad Núñez (2004) reporta que algunas plantas masculinas frecuentemente forman frutos. Estos frutos pueden contener pocas semillas o bien estar repleto de ellas. Las semillas de las flores masculinas se caracterizan por presentar una testa reducida y embriones con una curvatura diferente a la de organismos femeninos y hermafroditas. La autora sostiene que estas plantas deben de seguir considerándose masculinas puesto que “las posibilidades de éxito de estas semillas son muy escasas y su contribución a la adecuación del morfo se restringe exclusivamente a la producción de polen” (Núñez, 2004). Medel (2003) describe una población trioica en El Comitán, B.C.S. Sin embargo dentro de su estudio señala que los individuos que él denomina como “Hermafroditas con Esterilidad Parcial Femenina” en estudios posteriores deberían ser

considerados masculinos, principalmente por observar similitudes anatómicas de los óvulos con los masculinos y que de acuerdo con el autor “difícilmente podrían soportar frutos dada la semejanza de sus cámaras ováricas con los individuos masculinos”. El trabajo de Núñez (2004) demuestra que esta interpretación es falsa. En el presente trabajo se demostró que en la población de Guerrero Negro, de igual manera los individuos “masculinos” desarrollaron óvulos irregulares, así como sacos embrionarios. Las flores femeninas de *P. pringlei* siempre expresaron una sexualidad constante, y las masculinas presentaron una sexualidad lábil. Esta característica se ha encontrado en diversas especies subdioicas (Ehlers y Bataillon, 2007).

La caracterización de los sistemas sexuales de *P. pringlei* resulta una tarea sumamente complicada debido a diversas características que presenta esta especie. En primer lugar, su gran tamaño aunado con la ubicación apical de la región reproductiva dificulta poder realizar observaciones o experimentos con las flores. Además, algunas flores presentan irregularidades que pueden prestarse a interpretar individuos hermafroditas como femeninos (ausencia parcial de polen), o bien hermafroditas como masculinos (óvulos deformes). Estos elementos deben tenerse presentes en trabajos futuros que investiguen la sexualidad de esta especie.

### ***Pachycereus pringlei*: ¿Ruta ginodioecia → subdioecia → dioecia?**

En diversos trabajos referentes a los sistemas sexuales se han propuesto rutas evolutivas de algunos sistemas polimórficos, sin embargo aquellos que han recibido mayor atención son los sistemas dioicos y ginodioicos (Lloyd, 1974; Charlesworth y Charlesworth, 1978; Ross, 1982; Barrett, 2002; Spingler y Ashman, 2012).

En el caso particular de *P. pringlei*, parece muy probable que su ancestro presentara un sistema hermafrodita. Arias y Terrazas (2006) hacen un análisis cladístico y presentan un

cladograma donde se observa que el taxón más basal es *P. weberi*, el cual presenta un sistema hermafrodita (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). En el cladograma la siguiente terminal es *P. pringlei*, seguido de una politomía compuesta por *P. tepamo*, *P. grandis* y *P. pecten-aboriginum*. Esta última especie también es reportada con un sistema hermafrodita (Molina-Freaner *et al.*, 2004), lo cual permite suponer que el ancestro de todas estas especies era hermafrodita. Además todos los individuos de *P. pringlei* desarrollan flores con los dos verticilos sexuales, aunque alguno puede no ser completamente funcional. Quizás la poliploidía del ancestro de *P. pringlei*, haya provocado cambios que favorecieron la especiación. En cactáceas se ha relacionado la condición autopoliploide con la pérdida de los sistemas de autoincompatibilidad (Cohen y Tel-Zur, 2012). Por otro lado, se sabe que tanto *P. weberi* (Valiente-Banuet *et al.*, 1997) como *P. pecten-aboriginum* (Molina-Freaner *et al.*, 2004) son autoincompatibles, mientras que *P. pringlei* es autocompatible (Fleming *et al.*, 1994; Murawski *et al.*, 1994). Puede ser que la especiación se haya visto favorecida por la endogamia de los morfos hermafroditas debido a que en estos morfos no se ha registrado ningún tipo de autoincompatibilidad, ni depresión por endogamia. Además se han descrito diversos beneficios que puede traer consigo la endogamia, y se ha resaltado su importancia en el proceso de especiación (Joly, 2011). Por otro lado, en una revisión de la subdioecia Ehlers y Bataillon, (2007) señalan que la mayoría de las especies subdioicas se han originado a partir de la ginodioecia. Dos hechos sostienen esta afirmación; primero que la mayoría de las especies estudiadas presentan individuos hermafroditas que desarrollan flores perfectas. Además el sexo femenino presenta una expresión constante en los casos estudiados, mientras que los individuos masculinos pueden llegar a presentar un comportamiento irregular. Ambas características las comparte *P. pringlei*.

La condición poliploide puede ocasionar problemas en la producción de granos de polen (Cohen y Tel-Zur, 2012). En *P. pringlei* parece ser que esta condición origina los problemas presentados en las plantas femeninas durante la meiosis y es muy probable que de igual manera se generen alteraciones en la regulación de la MCP que se presenta en el androceo.

De los pasos propuestos por Spigler y Ashman (2012) de la transición de la ginodioecia a la dioecia, se interpreta que en *P. pringlei* el primer paso (Fig. 2A) (que involucra el establecimiento de poblaciones ginodioicas) ya se ha llevado a cabo. El segundo paso involucra dos posibilidades: una reducción gradual de la función femenina y una mayor asignación de recursos al desarrollo del androceo (Fig. 2B1). , o bien, una mutación en el morfo hermafrodita que haga perder la funcionalidad del gineceo y en consecuencia, se puedan identificar individuos femeninos, hermafroditas y masculinos (Fig. 2B2).

Los datos obtenidos en otras investigaciones (Medel, 2003; Núñez, 2004), sugieren que en *P. pringlei* se da una reducción de la función femenina en la forma hermafrodita. Sin embargo, no existe información que pueda ser interpretada de manera inequívoca como una transición hacia un estado dioico. Futuras investigaciones que busquen interpretar los sistemas sexuales que desarrolla *Pachycereus pringlei* deben considerar las irregularidades que presenta el androceo y llevar a cabo experimentos para poder evaluar de manera certera la funcionalidad de estos granos de polen irregulares.

## CONCLUSIONES

Las **flores hermafroditas** de *P. pringlei* presentaron MCP (como un proceso normal) en el tapete en la fase de microsporas libres. En algunas anteras se forman granos de polen esféricos, pero también pueden desarrollar granos de polen amorfos, de los cuales algunos entraron a un proceso anormal de MCP en fases muy tardías del desarrollo. Todos los granos producidos por esta forma presentan una exina continua (sin fragmentaciones).

Las **flores femeninas** de las dos poblaciones presentaron granos de polen colapsados, con exina gruesa y fragmentada. La MCP del tapete se da de manera retrasada, lo que parece estar relacionado con la sobreproducción de esporopolenina y la esterilidad del androceo.

Las **flores masculinas** desarrollaron tanto granos de polen esféricos (normales) como amorfos, sin signos positivos de MCP en ellos. Por el desarrollo presentado en el gineceo de estas flores, es correcto considerarlas como individuos **hermafroditas crípticos**.

La población de Cataviña presenta un sistema sexual ginodioico y la población de Guerrero Negro uno subdioico.

## LITERATURA CONSULTADA

- Aguilar-García S. A., D. M. Figueroa-Castro y C. Castañeda-Posadas. 2012. Pollen morphology of *Pachycereus weberi* (Cactaceae): an evaluation of variation in pollen size. *Plant Systematic Evolution* 298:1845-1850.
- Ai Y., Y. He, Y. Hu, Q. Zhang, C. Pan y M. Bao. 2014. Characterization of a novel male sterile mutant of *Tagetes patula* induced by heat shock. *Euphytica* 200: 159-173.
- Ainsworth C. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Albert B., M. E. Morand-Prieur, S. Brachet, P. H. Gouyon, N. Frascaria-Lacoste y C. Raquin. 2013. Sex expression and reproductive biology in a tree species, *Fraxinus excelsior* L. *Comptes Rendus Biologies* 336 (10): 479-485.
- Alfaro P. A. I. 2008. Estudio de la muerte celular programada durante el desarrollo de las anteras en flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* Engelmann y *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Bióloga), Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 61p.
- Anderson E. F. 2001. The cactus family. Timber Press. E.U.A. Portland. 776 p.
- Arias S. y T. Terrazas. 2006. Análisis cladístico del género *Pachycereus* (Cactaceae) con caracteres morfológicos. *Brittonia* 58(3): 197-216.
- Arias S. y T. Terrazas. 2009. Taxonomic revision of *Pachycereus* (Cactaceae). *Systematic Botany* 34(1): 68-83.
- Arias S. y J. Flores. 2013. La familia Cactaceae. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p: 492 – 504.



- Barrett, S. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews genetics* 3 (4): 274-284.
- Blackmore S., A. H. Wortley, J. J. Skvarla y J. R. Rowley. 2007. Pollen wall development in flowering plants. *The New Phytologist* 174(3): 483-498.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las cactáceas de México. Tomo 1. 2da. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 743 p.
- Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar. 1999. El interesante mundo de las cactáceas. 2da ed. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 233 p.
- Calderon-Urrea A. y S. L. Dellaporta. 1999. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* 126: 435 – 441.
- Camacho V. A. 2008. Desarrollo de las flores masculinas de la especie dioica *Pereskia portulacifolia* (L.) DC. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico D.F. 54 p.
- Cervantes S. M. P. 2001. Biología reproductiva de la cactácea *Pachycereus pringlei* (una planta trioica del desierto sonorense) en cuatro poblaciones con frecuencias contrastantes de sexos. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 81 p.
- Charlesworth B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88: 94-101.
- Charlesworth D. 2006. Evolution of plant breeding systems. *Current Biology* 16: 726-735.

- Cohen H. y N. Tel-Zur. 2012. Morphological changes and self-incompatibility breakdown associated with autopolyploidization in *Hylocereus* species (Cactaceae). *Euphytica* 184: 345-354.
- Coimbra S., L. Torrão e I. Abreu. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 537-541.
- Cuadrado G.A. y S. S. Garralla. 2009. Palinología de los géneros de Cactaceae *Maihuenia* (Maihuenioideae) y *Pereskia* (Pereskioideae) de Argentina. *Monplandia* 18 (1): 5-12.
- Cuevas E. y C. A. Abarca. 2006. Origen, mantenimiento y evolución del ginodioicismo. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 78: 33 – 42.
- Davis G. L. 1966. Systematic embryology of Angiosperms. JohnWiley and Sons. E.U.A. 528 p.
- Del Castillo R. y M. González-Espinoza. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71:185-196.
- Del Castillo R. F. y S. Trujillo-Argueta. 2009. Reproductive implications of combined and separate sexes in a trioecious population of *Opuntia robusta* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 96 (6): 1148-1158.
- Dellaporta S. L. y A. Calderon-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell* 5 (10): 1241- 1251.
- Dellaporta S. L. y A. Calderon-Urrea. 1994. The sex determination process in maize. *Science* 266: 1501-1505.

- Diggle P. K., V. S. Di Stilio, A. R. Gschwend, E. M. Golenberg, R. C. Moore, J. R. W. Russell y J. P. Sinclair. 2011. Multiple developmental processes underlie sex differentiation in angiosperms. *Trends in Genetics* 27(9): 368-376.
- Doorn W. G. van y E. J. Woltering. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* 10(3): 117-122.
- Ehlers B. K. y T. Bataillon. 2007. "Inconstant males" and the maintenance of labile sex expression in subdioecious plants. *New Phytologist* 174: 194-211.
- Erdtman G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy. Hafner. New York. 540 p.
- Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology - An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores. Munksgaard. Copenhagen. 486 p.
- Faegri T. y L. van der Pijl. 1979. The principles of pollination ecology, 3ra ed. Pergamond Press. Oxford. 244 p.
- Fleming T. H., S. Maurice, S. L. Buchmann y M. D. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81(7): 858 – 867.
- Fleming T. H., M. D. Tuttle y M. A. Horner. 1996. Pollination biology and the relative importance of nocturnal and diurnal pollinators in three species of Sonoran Desert columnar cacti. *The Southwestern Naturalist* 41(3): 257-269.
- Fleming T. H., S. Maurice y J. L. Hamrick. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* 12: 279 – 289.

- Flores-Rentería L., G. Orozco-Arroyo, F. Cruz-García, F. García-Campusano, I. Alfaro y S. Vázquez-Santana. 2013. Programmed cell death promotes male sterility in the functional dioecious *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). *Annals of Botany* 112: 789-800.
- Gadjev I., J. M. Stone y T. S. Gechev. 2008. Programmed cell death in plants: New insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell Molecular Biology* 270: 87-144.
- Gómez S. S. 2010. Embriología de la especie androdioica *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeberg (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 49 p.
- Grandont L., E. Jenczewski y A. Lloyd. 2013. Meiosis and its deviations in polyploid plants. *Cytogenetic And Genome Research* 140: 171-184.
- Greenberg J.T. 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12094-12099.
- Gutiérrez-Flores C., O. A. Lozano-Garza, J. L. León-de-la-Luz y F. J. García-de-León. 2014. Development and characterization of 10 microsatellite loci in the giant cardon cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Applications in Plant Sciences* 2(2): 1300066.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2007. Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México. 90 p.
- He C., U. Tirlapur, M. Cresti, M. Peja y D. E. Crone. 1996. An Arabidopsis mutant showing aberrations in male meiosis. *Sexual Plant Reproduction* 9: 54-57.
- Heslop-Harrison J. 1968. Pollen wall development. *Science* 161: 230 – 237.

- Hernández C. 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 (Bióloga), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 72 p.
- Hernández C. R. 2011. Estudio comparativo de la sexualidad floral de *Echinocereus coccineus* y *Echinocereus polyacanthus* (Cactoideae: Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Orientación Biología Experimental), Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico D.F. 78 p.
- Hernández-Hernández T., H. M. Hernández, J. A. De-Nova, R. Puente, L. E. Eguiarte y S. Magallón. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98(1): 44-61.
- Hunt D., N. Taylor y G. Charles. 2006. The new cactus lexicon: Descriptions and illustrations of the cactus family. Vol. 1. David Hunt Books. Reino Unido, Dorset. 373 p.
- Jackson R.C., J.J. Skvarla y W.F. Chissoe 2000. A unique pollen wall mutation in the family Compositae: Ultrastructure and genetics. *American Journal of Botany* 87(11): 1571-1577.
- Janczur M.K., H.J. León, L.T. Solache, C. H. Mendo, M. C. Oro, M. D. Mariezcurrena, I. V. Rivas, J. Manjarrez, J. L. Villareal y M. Czarnoleski. 2014. Chemical and physical defense traits in two sexual forms of *Opuntia robusta* in Central Eastern Mexico. *PLoS ONE* 9(3): e89535.
- Joly E. 2011. The existence of species rest on a metastable equilibrium between inbreeding and outbreeding. An essay on the close relationship between speciation, inbreeding and recessive mutations. *Biology Direct* 6(1): 62-116.

- Kim J. C., H. Laparra, A. Calderón-Urrea, J. P. Mottinger, M. A. Moreno y S. L. Dellaporta. 2007. Cell cycle arrest of stamen initials in maize sex determination. *Genetics* 177: 2547-2551.
- Kuriyama H. y H. Fukuda. 2002. Developmental programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5(6): 568-573.
- Kurtz E. B. 1963. Pollen morphology of the Cactaceae. *Grana Palynologica* 4(3): 367-372.
- Lloyd, D. G. 1974. Theoretical sex ratios of dioecious and gynodioecious angiosperms. *Heredity* 32(1): 11-34.
- Lockshin R. A. y Z. Zakeri. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36: 2405-2419.
- López-Curto M., J. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Las prensas de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 178 p.
- Mandujano M. C., I. Carrillo-Angeles, C. Martínez-Peralta y J. Golubov. 2010. Reproductive biology of Cactaceae. *Desert Plants* (10):197-230.
- Márquez J. 2013. Desarrollo del androceo. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p: 78 – 89.
- Medel N. A. 2003. Biología floral y estructura poblacional de cardón [*Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton & Rose (Cactaceae)] en el Comitán, Baja California Sur. Tesis de Maestría en Ciencias, Programa de Estudio de Posgrado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México, B.C.S. 89 p.

- Medel N. A. 2008. Estudio ecológico y genético del cardón (*Pachycereus pringlei*) en el Desierto Sonorense. Tesis de Doctorado en Ciencias (Orientación en Ecología), Programa de Estudio de Posgrado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México, B.C.S. 127p.
- Miesen F., M.E. de Porras y A. Maldonado. 2015. Pollen morphology of Cactaceae in Northern Chile. *Gayana Botanica* 72(2): 258-271.
- Mitchell C. H. y P. K. Diggle. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *American Journal of Botany* 92(7) 1068-1076.
- Molina-Freaner F., M. Cervantes-Salas, D. Morales-Romero, S. Buchmann y T. H. Fleming. 2003. Does the pollinator abundance hypothesis explain geographic variation in the breeding system of *Pachycereus pringlei*? *International Journal of Plant Sciences* 164(3): 383-393.
- Molina-Freaner F., A. Rojas-Martínez, T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet. 2004. Pollination biology of the columnar cactus *Pachycereus pecten-aboriginum* in north-western México. *Journal of Arid Environments* 56: 117-127.
- Murawski D. A., T. H. Fleming, K. Ritland y J. L. Hamrick. 1994. Mating system of *Pachycereus pringlei*; an autotetraploid cactus. *Heredity* 72: 86-94.
- Núñez M. C. Y. 2004. Cactáceas columnares de México: Estudio embriológico comparativo de cinco especies de la tribu Pachycereeae. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología), Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 187 p.



- Nyffeler R., y U. Eggli. 2010. A farewell to dated ideas and concepts: molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia* 6:109-149.
- Orozco A. G. 2012. Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de flores masculinas de *Opuntia stenopetala*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 109 p.
- Orozco A. y S. Vázquez. 2013. Sistemas de reproducción sexual. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p: 158 – 168.
- 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* 236:225-238.
- Ortega G. P. F. 2016. Florivoría de *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Cactaceae) en la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 67 p.
- Papini A., S. Mosti y L. Brighigna. 1999. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma* 207: 213-221.
- Parish R. W., y S. F. Li. 2009. Death of a tapetum: A programme of developmental altruism. *Plant Science* 178: 73-89.
- Perry L. E., J. R. Pannell y M. E. Dorken. 2012. Two's Company, Three's a Crowd: Experimental evaluation of the evolutionary maintenance of trioecy in *Mercurialis annua* (Euphorbiaceae). *PLoS ONE* 7(4): e35597.

- Pinkava D. J., M. G. McLeod, L. A. McGill y R. C. Brown. 1973. Chromosome numbers in some cacti of western north America-II. *Brittonia* 25(1): 2-9.
- Renner S. S. 2014. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: Dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of Botany* 101(10): 1588-1596.
- Rogers C.M. y B. D. Harris. 1969. Pollen exine deposition: A clue to its control. *American Journal of Botany* 56(10): 1209-1211.
- Rogers H. J. 2006. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annals of Botany* 97: 309-315.
- Ross M. D. 1982. Five evolutionary pathways to subdioecy. *The American Naturalist* 119(3): 297 – 318.
- Sanders P. M., A. Q. Bui, K. Weterings, K. N. McIntire, Y. C. Hsu, P. Y. Lee, M. T. Truong, T. P. Beals y R. B. Goldberg. 1999. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction* 11: 297-322.
- Shishkova S. y J. G. Dubrovsky. 2005. Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran Desert Cactaceae. *American Journal of Botany* 92(9): 1590-1594.
- Sidorchuk Y. V. y E. V. Deineko. 2014. Deformation of nuclei and abnormal spindles assembly in the second male meiosis of polyploid tobacco plants. *Cell Biology International* 38: 472-479.
- Silva M. J. A. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 61 p.

- Silva C.A., M. A. Oliva, M. Faria-Vieira y G. Wilson-Fernandes. 2008. Trioecy in *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae), a narrow endemic and threatened tropical species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51(5): 1003-1010.
- Sosa V. J. y T. H. Fleming. 1999. Seedling performance in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei*: Effects of maternity and paternity. *Plant Systematics and Evolution* 218: 145-151.
- Spigler R. B. y T. L. Ashman. 2012. Gynodioecy to dioecy: are we there yet? *Annals of Botany* 109: 531 – 543.
- Strittmatter L. I., V. Negrón-Ortiz y J. 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(2): 81-100.
- Strittmatter L. I., R. J. 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.
- Valiente-Banuet A., M. C. Arizmendi, A. Rojas-Martínez y L. Domínguez-Canseco. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and néctar-feeding bats in México. *Journal of Tropical Ecology* 12: 103-119.
- Valiente-Banuet A., A. Rojas-Martínez, A. Casas, M. C. Arizmendi y P. Dávila. 1997. Pollination biology of two Winter-blooming giant columnar cacti in the Tehuacán Valley, central México. *Journal of Arid Environments* 37: 331-341.
- Varnier A., F. Mazeyrat-Gourbeyre, R. S. Sangwan y C. Clément. 2005. Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the

tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *Journal of Structural Biology* 152: 118-128.

- Wu H. y Y. Cheung. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* 44: 267-281.
- Wu J., M. Q. Shahid, H. Guo, W. Yei, Z. Chen, L. Wang, X. Liu y Y. Lu. 2014. Comparative cytological and transcriptomic analysis of pollen development in autotetraploid and diploid rice. *Plant Reproduction* 27: 181-196.