



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

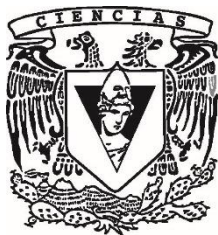
**DESARROLLO DE LA SEMILLA DE *Opuntia
stenopetala* (CACTACEAE)**

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:**

RODRIGO IKAL PAREDES ELIZALDE



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
(2016)**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Paredes
Elizalde
Rodrigo Ikal
04455-3671-2028
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307210461

2. Datos del tutor

Dra.
Sonia
Vázquez
Santana

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Margarita
Collazo
Ortega

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Aldebaran
Camacho
Velázquez

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Jorge Fernando
Rojas
Gutiérrez

7. Datos del trabajo escrito

Desarrollo de la semilla de *Opuntia stenopetala* (Cactaceae)
62 p.
2016

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de conocer la vida en toda la extensión de la palabra, desde que me brindó la oportunidad de ingresar a CCH sur, hasta aceptarme en esta bella carrera en la Facultad de Ciencias.

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.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias a cargo de la Dra. Silvia Espinosa Matías, quién se encargó del procesamiento del material y la toma de fotografías al MEB.

Al Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias a cargo de la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín, por su ayuda en la toma de microfotografías.

A la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, responsable técnico de la Unidad de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias, UNAM, por su asistencia y facilitar el uso del invernadero para llevar a cabo el experimento de germinación.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas y sus profesores: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Sonia Vázquez Santana, M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco y M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong, por permitirme entrar y aprender de todos ustedes.

A mis sinodales: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Sonia Vázquez Santana, M. en C. Aldebaran Camacho Velázquez y Biól. Jorge Fernando Rojas Gutiérrez, por sus correcciones, comentarios y aportaciones a este trabajo



GRACIAS...

Esta tesis se la dedico a mi familia; mi madre Atlántida, que admiro demasiado porque jamás se da por vencida... Mami siempre me escuchas y aconsejas, por ti estoy donde estoy, te amo como a nadie; mi padre Néstor, quien siempre me ha dado todo lo que necesito, un hombre del que yo me siento orgulloso; mi hermana Ameyalli, que siempre me apoya sin importar nada, hermanita siempre juntos; Blanca, Galy, Ángel y Everest, mis consejeros; Toby que siempre me recibe con sonrisas; MUCHAS GRACIAS FAMILIA.

A Soni, porque más que la directora de tesis, es mi amiga; siempre me apoyó, aconsejó, comprendió y brindo cariño, gracias por todo lo que me has enseñado.

A mis amigos Alde, Fati, Fer, Nadia, Pactli, Ros y Sandy, que me ayudaron en el trabajo de campo y me aconsejaron en el escrito, muchas gracias chicos.

A “favoritos”, cambiaron mi vida como no tienen una idea, entrar al museo y conocerlos ha sido de las mejores cosas que me han pasado; Aarón, Abigail, Alejandra, Eva, Gio, Paola y Susana, los amo. Muchas gracias Daniel, me enseñaste una forma de vida diferente.

A Samuel y el Abuelo, mis mejores amigos, sin sus consejos y sus palabras de aliento cuando todo iba mal, no hubiera salido adelante. A todos los demás: Bichi, Chucho, Diego, José, Mog, Oscar, Osnaya, Pollo, Tau, Veka, Wero, Winnie, gracias amigos.

A Topacio, Karlita y Andy, mis tres mejores amigas; Top siempre serás mi hermana, gracias por cuidarme y por hacerme ver mis errores; Geme que me has enseñado a valorar las amistades; Andy muchas gracias por todas esas tardes de platica y consejos.

A los cachorros, mi Toñito, uno de mis mejores amigos, siempre sabiendo que decir. Chalo, Papaloi, Miyagui y Vic, mis amigos, gracias por esos momentos que jamás olvidaré, los quiero mucho.

A mi Aleja... Me ayudaste mucho, me diste ánimos e impulsaste cuando ya no quería seguir adelante, jamás me dejaste caer. Yo solo sé que tengo la mejor novia del mundo.

Muchas gracias baby, eres mi amor verdadero, te amo mucho.

Por último... A mi abuelo TRIUNFO ELIZALDE, que desgraciadamente se me adelantó y no pudo estar en este momento importante de mi vida... Abuelito mi tesis es para ti donde quieras que estés... TU NIETECITO.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
La flor de las cactáceas	4
La semilla	6
La semilla de las cactáceas	8
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Sistema de estudio	13
Sitio de estudio	13
Polinizaciones controladas en campo	13
Polinización abierta natural (control)	14
Polinización cruzada manual	14
Tratamiento de apomixis	14
Análisis morfoanatómico de frutos y semillas	14
Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	15
Germinación	16
RESULTADOS	17
Morfología de flores y frutos	18
Óvulos de las flores femeninas	20
Cambios morfológicos de coloración durante el desarrollo de frutos y semillas	23
Polinizaciones controladas en campo	26
Desarrollo de las semillas	28
Embriogénesis	28
Endospermogénesis	33

Desarrollo de la cubierta seminal y cubierta funicular	35
Morfología de semillas maduras en MEB	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIÓN	49
LITERATURA CITADA	51



RESUMEN

Opuntia stenopetala es una especie dioica (que presenta tanto individuos femeninos como masculinos), su distribución es hacia el centro de México. Se realizaron tratamientos de polinización, para conocer el origen (sexual o asexual) de las semillas y describir el desarrollo y anatomía de éstas. Se fijaron y procesaron botones florales cercanos a la antesis y flores en antesis de flores femeninas; así como frutos inmaduros y maduros, utilizando la microtecnica convencional de inclusión en parafina, LR-White, microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido.

Se describen las características de los óvulos y el desarrollo de la semilla. El óvulo es campilótropo, bitégmico y crasinucelado, con un funículo circinótropo que rodea a los tegumentos interno y externo, formando una cubierta funicular que posterior a la fecundación presenta modificaciones estructurales. El saco embrionario maduro antes de la fecundación presenta en la zona micropilar el aparato ovocelular, formado por una ovocélula y dos sinérgidas, la célula central tiene dos núcleos polares rodeados de granos de almidón, las antípodas ubicadas en la zona calazal degeneran tempranamente. Después de la fecundación de la ovocélula el cigoto se divide transversalmente, la célula basal forma el suspensor, el cual es relativamente amplio en etapa globular, se observaron también las etapas de corazón, torpedo y cotiledonaria. En escasas semillas se encontró un embrión adicional, aunque no se observó si se originan de la nucela o suspensor. El endospermo es de tipo nuclear y se celulariza durante el desarrollo, a diferencia de otras cactáceas, el endospermo tiene un dominio calazal, donde los núcleos son grandes y rodeados de mucho citoplasma, en contraste con el poco citoplasma que rodea a los núcleos espaciados que se encuentran en el resto del saco embrionario. La nucela persiste después de la fecundación y forma el perispermo, el cual junto con el endospermo son escasos en semilla madura. Ambos tegumentos forman parte de la cubierta seminal, pero sólo el exotegmen y restos de la endotesta perduran, el exotegmen es la capa mecánica de la semilla, así como la parte interna de la cubierta funicular. Existe un canal de agua formado, por células parenquimáticas, el cual se ubica en la zona donde el funículo es libre y se dirige a la placenta (zona donde no forma una cubierta funicular). Se confirma que las semillas en *O. stenopetala* tienen un origen sexual.



INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son endémicas del continente americano, aunque con el tiempo se han ido introduciendo en todo el mundo, se encuentran principalmente en zonas áridas y semiáridas. Las plantas de la familia Cactaceae son perennes y su tiempo de vida puede ser desde dos años hasta más de 100 años, dependiendo la especie (Bravo-Hollis, 1978). Las aréolas son la característica principal de las cactáceas, las cuales son zonas meristemáticas con la capacidad de dar origen a hojas, tallos, flores, espinas, tricomas y glóquidas en algunas especies (Arreola, 1997).

Anderson (2001) reconoce cuatro subfamilias para Cactaceae: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae, esta última dividida en nueve tribus. La subfamilia Opuntioideae ocupa la segunda posición (después de Cactoideae) en cuanto a número de especies dentro de la familia Cactaceae (Anderson, 2001) y la característica distintiva la presencia de glóquidas (aguates), que aparecen en casi todas las aréolas de los tallos, flores y frutos (Guzmán, 1997). Cactoideae está formada por plantas rastreras, arbustivas y arborescentes, los tallos pueden ser cilíndricos, claviformes, globosos o en cladodios ramificados. En México está representada por los géneros *Cylindropuntia*, *Grusonia*, *Nopalea*, *Opuntia* y *Pereskiopsis* (Guzmán *et al.*, 2007).

El género *Opuntia* es el más diverso de la familia Cactaceae y el más ampliamente distribuido. Empíricamente se cree que el éxito ecológico y evolutivo del género se debe tanto a la reproducción sexual como a la multiplicación vegetativa a través de la fragmentación de sus cladodios articulados (Anderson, 2001; Reyes-Agüero *et al.*, 2006). Las características diagnósticas de las especies de *Opuntia* se centran en lo siguiente: los tallos son aplanados y articulados (cladodios), las hojas son pequeñas, cilíndricas o cónicas y se pierden tempranamente en las plántulas, las aréolas tienen fieltro o pelos blanquecinos y abundantes glóquidas (aguates), las flores son diurnas o vespertinas y van de amarillentas, anaranjadas a rojas (Scheinvar, 2004).

El género *Opuntia* posee alrededor de 181 especies de acuerdo a Anderson (2001), 200 conforme a Hunt (1999) y más de 300 especies según Scheinvar (2004). Es un género que se distribuye desde Canadá hasta el sur de Argentina, con formas de vida arbustivas, arborescentes o rastreras. En México se encuentra en zonas áridas, semiáridas, en bosques de coníferas, de encinos, dunas costeras y pastizales. Scheinvar *et al.* (2010) reportan entre 93 y 104 especies de *Opuntia* para México. Se han obtenido cerca de 144 variantes de *Opuntia* a través de la domesticación en diferentes ambientes y países (Arias, 1997). *Opuntia* se clasifica en la tribu Opuntieae, un clado bien definido de la subfamilia Opuntioideae (Wallace y Dickie, 2002), en esta tribu también se incluyen los géneros *Consolea*, *Brasilopuntia*, *Miqueliopuntia*, *Nopalea*, *Tacinga*, *Salmiopuntia* y *Tunilla* (Majure *et al.*, 2012).

A pesar de que Bravo-Hollis (1978) y Scheinvar (2004) han descrito a las especies de Opuntioideae como monoicas o dioicas, el monoicismo no ha sido comprobado en la familia Cactaceae como lo sugieren estas autoras. Cabe mencionar que las especies de *Opuntia* son generalmente hermafroditas, pero algunas especies como *Opuntia robusta* pueden tener además poblaciones trioicas, dioicas (Del Castillo *et al.*, 1988) o ginodioicas (Jancsur *et al.*, 2014), mientras que para *Opuntia stenopetala*, la especie objeto de este estudio, sólo se han determinado poblaciones dioicas (Orozco-Arroyo *et al.*, 2012; Flores-Rentería *et al.*, 2013).



ANTECEDENTES

La flor de las cactáceas

En la reproducción sexual de las angiospermas es necesario un conjunto de hojas especializadas que forman a la flor, la cual se define como la agregación de órganos reproductores estériles y fértiles para la reproducción sexual (Mauseth, 1995). Las flores de la mayoría de las especies de Cactaceae son bisexuales, formando sistemas sexuales hermafroditas. Sin embargo, en este grupo también existen otros sistemas sexuales como el dioico, ginodioico, trioico y subdioico, los cuales se reportan en 27 especies de 8 géneros (Camacho, 2013; Flores-Rentería *et al.*, 2013). En la subfamilia Opuntioideae, en particular *Opuntia stenopetala* presenta un sistema dioico comprobado, en el cual las flores unisexuales retienen en la antesis reminiscencias del sexo opuesto (Orozco, 2002; 2005; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012; Flores-Rentería *et al.*, 2013).

En las cactáceas las flores se originan en las aréolas y se presentan en diferentes partes del tallo. En éstas se pueden apreciar órganos de origen axial (zona pedicelar y el hipantio o tubo receptacular) y los de origen floral (el perianto, el androceo y el gineceo). El desarrollo se inicia por una yema axial, donde se diferencian tres zonas meristemáticas: la más externa da origen a los órganos del perianto, representados por los tépalos; en posición intermedia, se producen los estambres, y la más central origina los carpelos, los cuales al hundirse dentro del tallo formarán el pericarpelo y el ovario; el hipantio formará el tubo floral (Bravo–Hollis, 1978). Se presenta una transición gradual de las brácteas hacia el ápice de la flor, éstas llegan a formar los segmentos del perianto, los tépalos, que son estructuras parecidas a sépalos y pétalos y que cumplen la misma función (Anderson, 2001), pero que no pueden diferenciarse entre sí (Bravo–Hollis, 1978). Las flores de las cactáceas por lo regular son sésiles, solitarias y con simetría radial. La mayoría de las cactáceas llevan a cabo polinización cruzada, pero la autogamia o autopolinización puede ocurrir en algunos grupos (Anderson, 2001).

Las flores del género *Opuntia* (Fig. 1), incluidas las de *O. stenopetala*, generalmente presentan muchos estambres insertos espiraladamente en la cara interna del tubo floral. El ovario está embebido en el pericarpelo, siendo ínfero debido a que está localizado por debajo de las otras partes florales. El ovario es multicarpelado y la placentación es parietal.

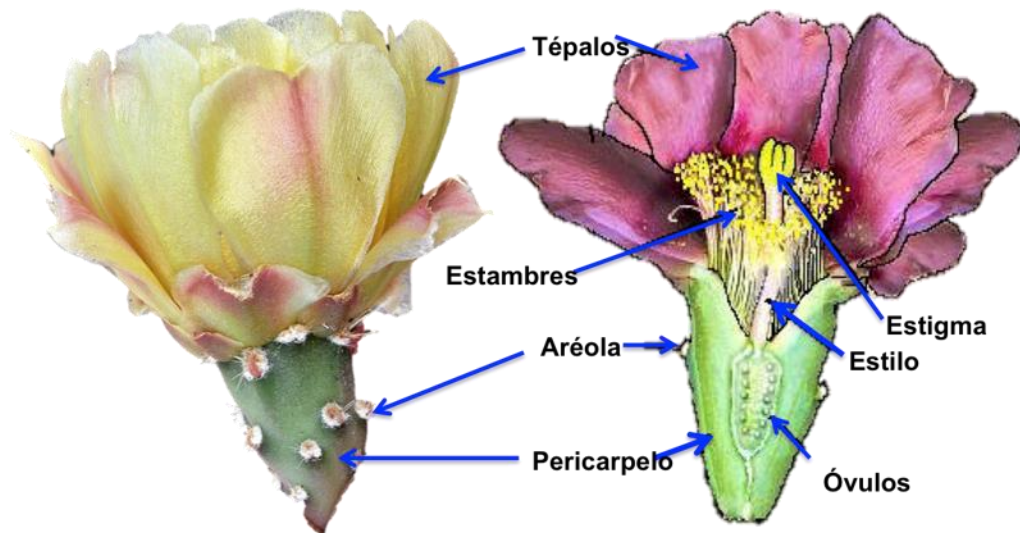


Figura 1. Flor (a la izquierda) y esquema (a la derecha) de *Opuntia* para visualizar sus componentes.

Las flores de *O. stenopetala*, miden entre 2.5-3.2 cm de largo, no abren ampliamente en antesis. El androceo está formado por numerosos estambres de color anaranjado y alcanzan el tercio superior del perianto, mientras que el estilo es robusto, color anaranjado y la base es verdosa; los lóbulos del estigma son amarillos y se presentan de ocho a nueve; el ovario es ínfero. La parte externa del pericarpelo es rugosa, de color verde grisáceo con tintes rojizos, con paredes gruesas, espinas rígidas o setosas y aréolas pequeñas, poseen lana blanca emergente y también escamas lineales acuminadas de color rojo. Los segmentos del perianto (tépalos) son rojo-anaranjados (Orozco, 2002, 2005; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012; Flores-Rentería *et al.*, 2013).

Opuntia stenopetala es una especie dioica a lo largo de su distribución en el centro de México, los individuos masculinos presentan flores con un androceo fértil y un gineceo atrofiado (no hay formación de óvulos maduros) y se denominan estaminadas. Los individuos femeninos presentan flores con un gineceo fértil y un androceo atrofiado (el desarrollo de la antera se detiene en etapa de célula madre de la microspora), se denominan pistiladas (Orozco, 2002, 2005; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012; Flores-Rentería *et al.*, 2013).

La semilla

La semilla es la unidad estructural de reproducción, propagación y diseminación de las gimnospermas (con semillas desnudas) y las angiospermas (con semillas encerradas en un fruto; Márquez y Jiménez, 2013). Las semillas son las encargadas de dar origen a nuevos individuos, ya que éstas contienen al embrión que obtendrá del tejido de reserva los nutrimentos necesarios para su desarrollo y germinación (Vázquez-Yáñez *et al.*, 1997). Existe una gran diversidad en cuanto a morfología, dando diferencias en tamaño, forma, color, contenido energético, sustancias de reserva, longevidad y latencia (Vázquez-Yáñez *et al.*, 1999).

Después de la fecundación, el óvulo da origen a la semilla (Tabla 1). Por lo tanto, una semilla es un óvulo fecundado que posee un embrión, un tejido de reserva y una cubierta seminal protectora. Después de que la ovocélula es fecundada por uno de los núcleos espermáticos del grano de polen (singamia) se forma el cigoto. El otro núcleo espermático se unirá con los dos núcleos polares de la célula central para dar lugar al endospermo (triple fusión), la formación de este junto con la del cigoto, se conoce como doble fecundación.

El cigoto se desarrolla en el embrión mediante una serie de divisiones celulares organizadas conocida como embriogénesis y el endospermo se desarrollará durante la endospermogénesis. Al terminar estos procesos, una semilla completa contiene embrión, endospermo y cubierta seminal, esta última se forma del (los) tegumento(s). Si la nucela permanece después de la fecundación forma un segundo tejido de reserva, el perispermo (Márquez y Jiménez, 2013).

Tabla 1. Características comparativas de los diversos componentes de un óvulo al ocurrir la doble fecundación y convertirse en semilla (Tomada de Márquez y Jiménez, 2013).

PARTES DEL ÓVULO	PARTES DE LA SEMILLA
Ovocélula (Gameto Femenino)	Embrión
Célula central	Endospermo
Nucela	Perispermo
Tegumento interno	Tegmen (Cubierta seminal)
Tegumento externo	Testa (Cubierta seminal)
Funículo	Hilo (al desprenderse el funículo de la placenta)
Rafe	Rafe
Cálaza	Cálaza
Micrópilo	Micrópilo

En el caso de óvulos unitégmicos la cubierta seminal corresponde a la transformación del tegumento en testa (y ambos son sinónimos). Pero si el óvulo es bitégmico la cubierta seminal es más compleja, formada por testa y tegmen; la testa deriva del tegumento externo (diferenciándose en exotesta, mesotesta y endotesta), mientras que el tegmen deriva del tegumento interno (diferenciándose en exotegmen, mesotegmen y endotegmen; Márquez y Jiménez, 2013).

Las semillas (Fig. 2, Tabla 1), tienen otros componentes como el hilo, la rafe, el micrópilo, el funículo, la cálaza. El hilo es el límite de la semilla y corresponde a la cicatriz que deja el funículo cuando la semilla se desprende del fruto. La rafe, es la zona entre el hilo y la cálaza, la cual generalmente contiene al haz vascular. El micrópilo, que, aunque rara vez es visible porque se obstruye después de la entrada del tubo polínico, es una estructura cuya posición puede deducirse por la cercanía de la radícula. La cálaza es la zona donde la nucela se une a los tegumentos (Márquez y Jiménez, 2013).

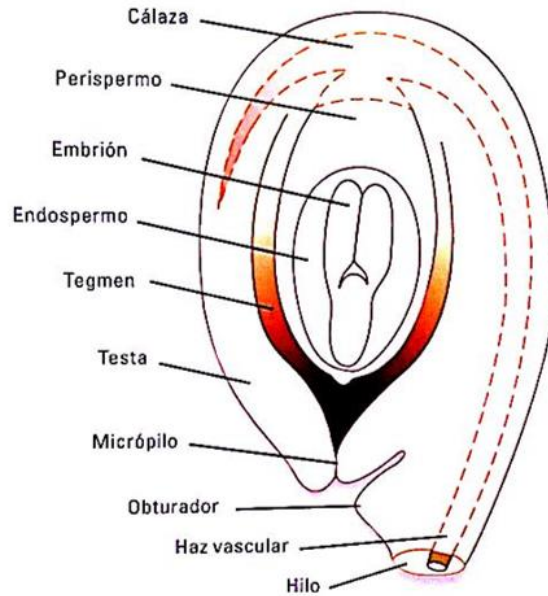


Figura 2. Esquema de los componentes de la semilla (Modificado de Márquez y Jiménez, 2013).

La semilla de las cactáceas

Las características embriológicas generales de Cactaceae para la parte femenina son: (1) óvulos bitégmicos, crasinucelados, óvulos con un espacio de aire cercano a la cálaza entre los dos tegumentos, (2) micrópilo formado por el tegumento interno, (3) nucela curva, (4) saco embrionario con antípodas efímeras, (5) endospermo tipo nuclear, (6) poliembrionía de origen nucelar y del suspensor y (7) semilla perispérmica, albuminosa (con endospermo) y arilada. Los datos embriológicos sobre aspectos de óvulos y semillas se limitan sólo a algunas especies de los géneros como *Mammillaria* (Tiagi 1956, 1957; Parada 2004; Sánchez 2007), *Opuntia* (Archibald 1939; Maheshwari y Chopra 1954, 1955; Tiagi 1954; Chopra 1957; Orozco 2002, 2005; Silva 2007; Hernández 2008), *Pereskia* (Neumann 1935; Tiagi 1967; Jiménez-Durán *et al.*, 2014), *Rhipsalis* (Mauritzon 1934, citado en Flores y Engleman 1976), *Astrophytum*, *Thelocactus* y *Toiuneya* (Engleman 1960), *Neobuxbaumia* (Gómez, 2010; Ortega, 2016), *Echinocereus* (Hernández, 2011), *Pachycereus* (Núñez, 2004; Carrasco, 2016).

Los tipos de óvulos en angiospermas se ilustran en la figura 3 (A-F), los cuales se clasifican de acuerdo a la posición del micrópilo, cálaza y funículo, así como de la forma del saco embrionario. Para Cactaceae se han reportado óvulos de tipo anátropo (Fig. 3C), campilótropo (Fig. 3D) y anfítropo (Fig. 3E), este último con mayor curvatura (con respecto al campilótropo) para permitir el albergue de embriones grandes en poca área (Archibald, 1939; Tiagi, 1954; Maheshwari y Chopra, 1955; Flores y Engleman, 1976). Algunas veces se han mencionado óvulos circinótropos para Cactaceae (Fig. 3F), sin embargo, Flores y Engleman (1976) consideran que el término circinótropo es un aspecto que describe al funículo circundante, no al óvulo. Estos mismos autores mencionan como tipo de óvulo dominante en esta familia al anfítropo (Fig. 3E).

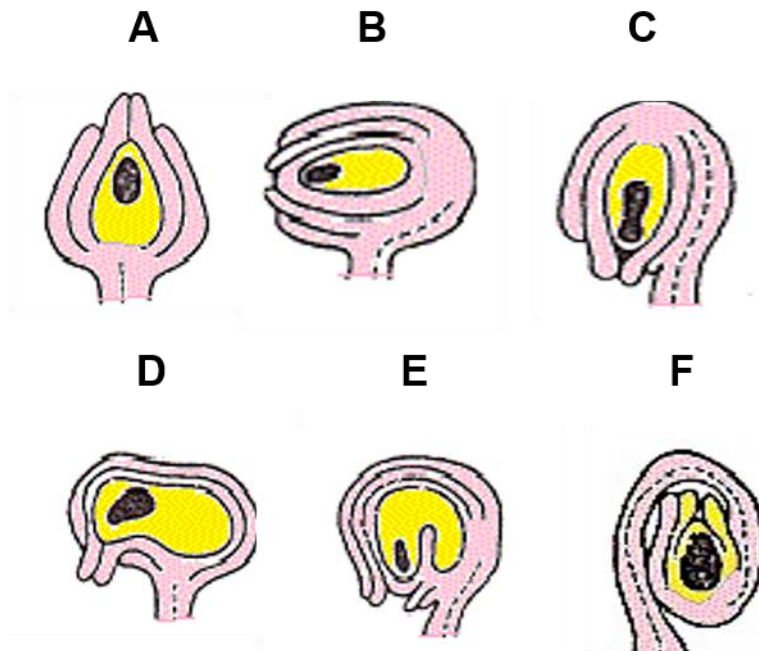


Figura 3. Tipos de óvulos más frecuentes en Angiospermas. A. Ortótropo. B. Hemianátropo. C. Anátropo. D. Campilótropo. E. Anfítropo. F. Circinótropo.

Las semillas de las cactáceas tienen diferentes formas (oval, elíptica, alargada, acorazonada o irregular), tamaños, colores, variaciones en el embrión y tejidos de reserva. La variación de las semillas es de gran importancia filogenética y taxonómica (Bravo–Hollis, 1978). En una semilla madura de Cactaceae encontramos: el embrión, el perispermo, el endospermo, el micrópilo, el funículo y la cubierta seminal. El embrión es grande y ocupa toda la cavidad de la semilla, posee cotiledones grandes y curvos, excepto en Cactoideae, donde los cotiledones son pequeños. En las cuatro subfamilias, la nucela constituye el perispermo (Flores y Engleman, 1976).

El tegumento externo del óvulo posee abundantes taninos en el interior de sus células, los cuales le confieren dureza a la testa que cubre a la semilla. La testa varía en color (castaño, anaranjado, café y negro en diversas tonalidades), ornamentación y resistencia. La testa puede ser lisa (*Pereskia* y *Pachycereus*), pero la mayoría de las veces posee ornamentaciones, como engrosamientos, encogimientos, abombamientos o hundimientos que dan origen a estructuras reticuladas (*Coryphantha*), corrugadas (*Mammillaria tetrancistra*), foveoladas (géneros de *Mammillaria*) o tuberculadas. En el género *Opuntia* el funículo, que rodea a la semilla, se adhiere a los tegumentos y se endurece fuertemente; por tanto, es una cobertura adicional que posiblemente sea una adaptación para mayor protección de la semilla (Bravo–Hollis, 1978).

El número de semillas por fruto es muy variado para la familia Cactaceae. Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yáñez (2000) indican que pueden haber más de 1000 semillas por fruto o muy pocas de 1 a 5. Por ejemplo, *Epiphyllum anguliger* tiene en promedio 1500 semillas por fruto, en *Ferocactus histrix* algunos frutos contienen 300 semillas, pero hay otras especies donde se tienen hasta 2200 semillas (Del Castillo, 1986), en *Neobuxbaumia mezcalaensis* hay 111 semillas por fruto y en *Stenocereus queretaroensis* hay 816 semillas (Loza-Cornejo, 2004). Algunas semillas de Cactaceae pueden albergar más de un embrión (poliembrionía). Se ha reportado poliembrionía en varias especies de *Mammillaria* (Tiagi 1956, 1957); *Opuntia* (Maheswari y Chopra, 1955) y *Pereskia* (Tiagi, 1967).

A pesar de que *Opuntia stenopetala* ha sido estudiada con detalle su sistema sexual dioico y la descripción detallada del dimorfismo sexual, aún queda por describir el desarrollo de la semilla. Asimismo, falta indagar si las semillas que se forman son producto de un proceso sexual (fecundación) o bien ocurren como resultado de un proceso apomíctico, como en otras especies del género *Opuntia*. Por ello en la presente investigación se indagó sobre el desarrollo de la semilla y los mecanismos que *O. stenopetala* utiliza para la formación de éstas.



OBJETIVOS

Objetivo general

- Conocer el origen (sexual o asexual) y desarrollo de las semillas de la especie dioica *Opuntia stenopetala*.

Objetivos particulares

- Describir la morfología de las semillas de *Opuntia stenopetala*.
- Determinar si el proceso por el que se forman las semillas es de origen sexual y/o apomíctico.
- Describir el desarrollo del embrión, la cubierta seminal y los tejidos de reserva.



MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio. *Opuntia stenopetala* Engelm. es comúnmente conocido como “nopal arrastradillo” es un arbusto rastrero cuyas ramas principales nacen desde la base, apoyándose en el suelo por el margen de los artículos, éstos son oblongos u obovados, de 10-25 cm de longitud, color verde grisáceo. Las hojas son pequeñas, de color rojo brillante y solamente se encuentran en los artículos jóvenes. Las aréolas presentan una mancha purpura que las rodea, las espinas son color blanco, miden de 2-5 cm de longitud. Las glóquidas son abundantes en los artículos jóvenes, de tono amarillento a rojizo, pasando a ser negras con la edad. Los frutos son globosos, de 5 cm de largo por 4.5 cm de ancho, de color rojo púrpura (Bravo-Hollis, 1978). Las semillas son pequeñas, lisas, de 3 mm de espesor, discoideas, color café amarillento (Alfaro, 2008). La floración de acuerdo con Orozco (2002) se da desde marzo hasta junio, encontrando frutos maduros a partir de mayo hasta septiembre. Se distribuye en los estados de Aguascalientes, Coahuila, Durango, Guanajuato Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas.

Sitio de estudio. El material de *O. stenopetala* fue colectado en dos localidades ubicadas en el Municipio de Cadereyta, Querétaro, sobre la carretera que va de Cadereyta a Vizarrón La primera se localiza en el kilómetro 12 (26° 00.000' N 104° 03.750' W) a 1959 msnm y la segunda en el kilómetro 17 (20° 41.212' N 99° 35.933' W) a 1969 msnm. Se presenta una vegetación de tipo matorral xerófilo.

Polinizaciones controladas. Para conocer si las semillas se forman por vía sexual o asexual se realizaron tres tratamientos de polinización en el campo (Polinización abierta natural, polinización cruzada manual y apomixis) y una más en invernadero (apomixis). Debido a que *O. stenopetala* es dioica (Orozco, 2002; Flores, 2005; Orozco-Arroyo *et al.*, 2012; Flores-Renteria *et al.*, 2013) las flores masculinas fueron descartadas de cualquier tratamiento de polinización, los cuales se aplicaron sólo en flores femeninas.

- 1. Polinización abierta natural (Control).** Se marcaron 30 flores expuestas de 30 individuos femeninos, no se cubrieron, sólo se marcaron con etiquetas y después de 2 meses se contaron las semillas producidas en cada fruto.
- 2. Polinización cruzada manual.** Se utilizaron 30 individuos femeninos, una flor por individuo. Cada flor en antesis se polinizó manualmente con una mezcla de polen de flores de individuos masculinos, se cubrieron con bolsas de tul y se marcaron. No fue necesario emascular, porque las anteras no producen polen. Dos meses después se contaron las semillas de cada fruto.
- 3. Tratamiento de Apomixis.** Este tratamiento se realizó en Campo y en Invernadero. *En el campo* se cubrieron 33 botones de flores femeninas cercanas a la antesis con bolsas de tul y se esperó un lapso de 30 días para saber si formaban semillas o no. *En el invernadero* de la Facultad de Ciencias (en ausencia de visitantes florales) las flores femeninas de este tratamiento no se cubrieron con tul y se esperó un lapso de 15 días para saber si formaban semillas o no. Este tratamiento adicional de apomixis se realizó en invernadero porque en el campo es inevitable la visita de ciertos insectos, los cuales logran meterse a las flores, aunque estén cubiertas con tul.

Análisis morfoanatómico de frutos y semillas. Se colectaron frutos en diversas etapas de desarrollo, tanto de polinización abierta experimental como de polinización natural. Los frutos se clasificaron en tres etapas principales: jóvenes, intermedios y maduros, tomando en consideración el tamaño, el color de las semillas, de la pulpa y de la superficie del fruto, las cuales se describirán posteriormente. Las semillas de las etapas jóvenes e intermedias se fijaron en FAA, se realizaron dos lavados con agua corriente de diez minutos cada uno, en etanol 50% y se almacenó el material en etanol al 70%. Mientras que a las semillas de los frutos maduros se les retiró el exceso de la pulpa y se dejaron secar a temperatura ambiente.

De las semillas colectadas y fijadas se separaron 10 semillas de cada una de las etapas jóvenes e intermedias para lijarlas y con esto remover parte de la testa (en el caso de semillas maduras la remoción de las cubiertas fue casi completa), después se llevó a cabo una deshidratación en etanoles graduales 70%, 85%, 96%, 100% y 100% durante 3 h en cada cambio, posteriormente se pasaron por xilol durante 15 minutos, se impregnaron en xilol-paraplast durante 24 h, en Paraplast puro 24 h y se incluyeron en Paraplast. Se realizaron cortes de 9-11 μm de grosor en un micrótopo de rotación American Optical 820. Los cortes histológicos se desparafinaron y se tiñeron con safranina-verde rápido en metilcelosolve (López *et al.*, 2005), y se tomaron fotografías. Algunos óvulos en diferentes etapas de desarrollo y semillas jóvenes, se incluyeron en la resina plástica LR-White, para ello después de la deshidratación hasta etanol al 100%, se infiltraron en una mezcla de etanol 100% y LR-White durante 12 h, posteriormente se pasaron a LR-White puro durante 72 horas a 4 °C y finalmente se incluyeron en cápsulas de gelatina con LR-White puro y se polimerizaron en una estufa a 60 °C; se obtuvieron cortes de 1-2 μm , se tiñeron con azul de toluidina y se montaron con resina plástica Entellan.

Microscopia electrónica de barrido (MEB). Esta técnica se utilizó para conocer la morfología de todos los componentes de la semilla. Algunas semillas maduras se llevaron a punto crítico con CO₂ en una desecadora CPD-030 Bal-Tec, posteriormente se montaron en portaobjetos metálicos con cinta adhesiva cubierta de carbón, se cubrieron con partículas de oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk-II y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV para obtener microfotografías.

Germinación. Con la finalidad de saber cuántas plántulas surgen de cada semilla y corroborar si hay más de un embrión por semilla, se tomaron 100 semillas maduras de diversos frutos y se pusieron a germinar en cajas Petri con papel absorbente en el invernadero de la Facultad de Ciencias. Una vez que las semillas germinaron se trasplantaron a macetas con tierra, para que la planta siguiera creciendo.



RESULTADOS

Las plantas de *Opuntia stenopetala* son de hábito rastrero y florecen de marzo a junio, cuando comienza la primavera. Al inicio de la floración, las aréolas se activan y comienzan a formar tanto nuevos cladodios como flores (Fig. 4). Asimismo, si existe separación de los cladodios de la planta madre, éstos se establecen como clones, lo cual es muy común en esta especie durante la fructificación, ya que, cuando los animales consumidores de los frutos (caballos, burros y cabras) los muerden, éstos pueden desprenderse junto con el cladodio, representando una propagación vegetativa (o reproducción asexual).

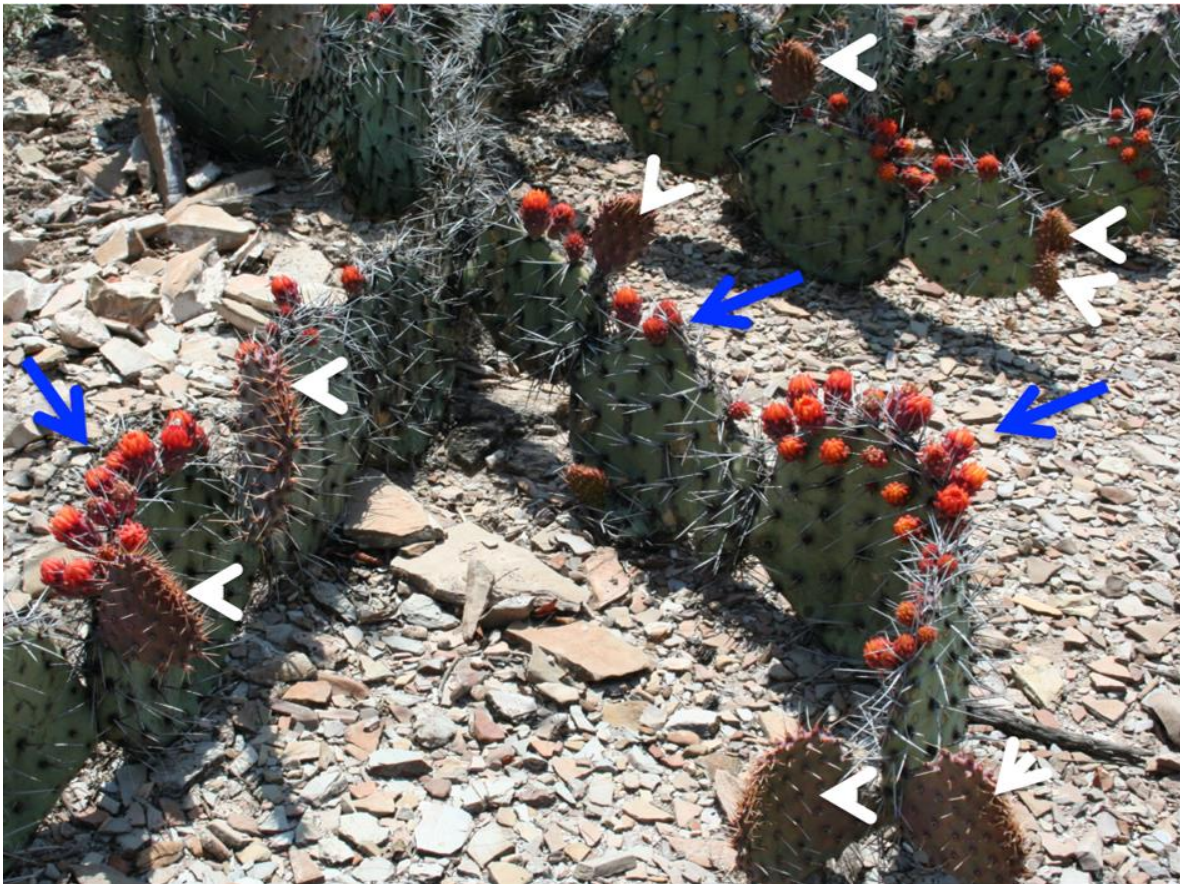


Figura 4. Planta de *Opuntia stenopetala* al inicio de la primavera. Mostrando su hábito rastrero y la formación de nuevos cladodios (cabeza de flecha) y flores (flechas).

Morfología de flores

Opuntia stenopetala es un especie dioica que presenta flores masculinas y flores femeninas en diferentes individuos. La duración de la flor en antesis es de 3-4 días. Durante la antesis las anteras de las flores masculinas son dehiscentes en las primeras horas de la mañana para liberar el polen (Fig. 5A), el cual es transportado principalmente por abejas y abejorros; a pesar de que el síndrome de la flor parece ser de tipo ornitófila por el color rojo-anaranjado, nunca se han observado aves visitando a las flores. Las flores masculinas presentan un estilo reducido sin estigma y un ovario que generalmente carece de óvulos (los óvulos que se llegan a presentar, se detienen en la célula madre de la megaspora; Fig. 5B).

En las flores femeninas al momento de la antesis se extiende el estigma, el cual se divide en 8-10 lóbulos estigmáticos de color amarillo (Fig. 5C). Únicamente las flores femeninas desarrollan frutos, los cuales se forman del ovario ínfero y unilocular, que contiene numerosos óvulos con placentación parietal. Los estambres de las flores femeninas no producen polen, por lo tanto, se consideran estaminodios (Fig. 5D).

Aproximadamente a las 48-70 horas postpolinización los tubos polínicos alcanzan el micrópilo del óvulo para llevar a cabo la fecundación. Después del tercer o cuarto día de postpolinización, los óvulos comienzan a crecer y el ovario a ensancharse, aunque aún se observa el perianto (Fig. 5E), que se cae un par de días después y el pericarpelo comienza a marchitarse.



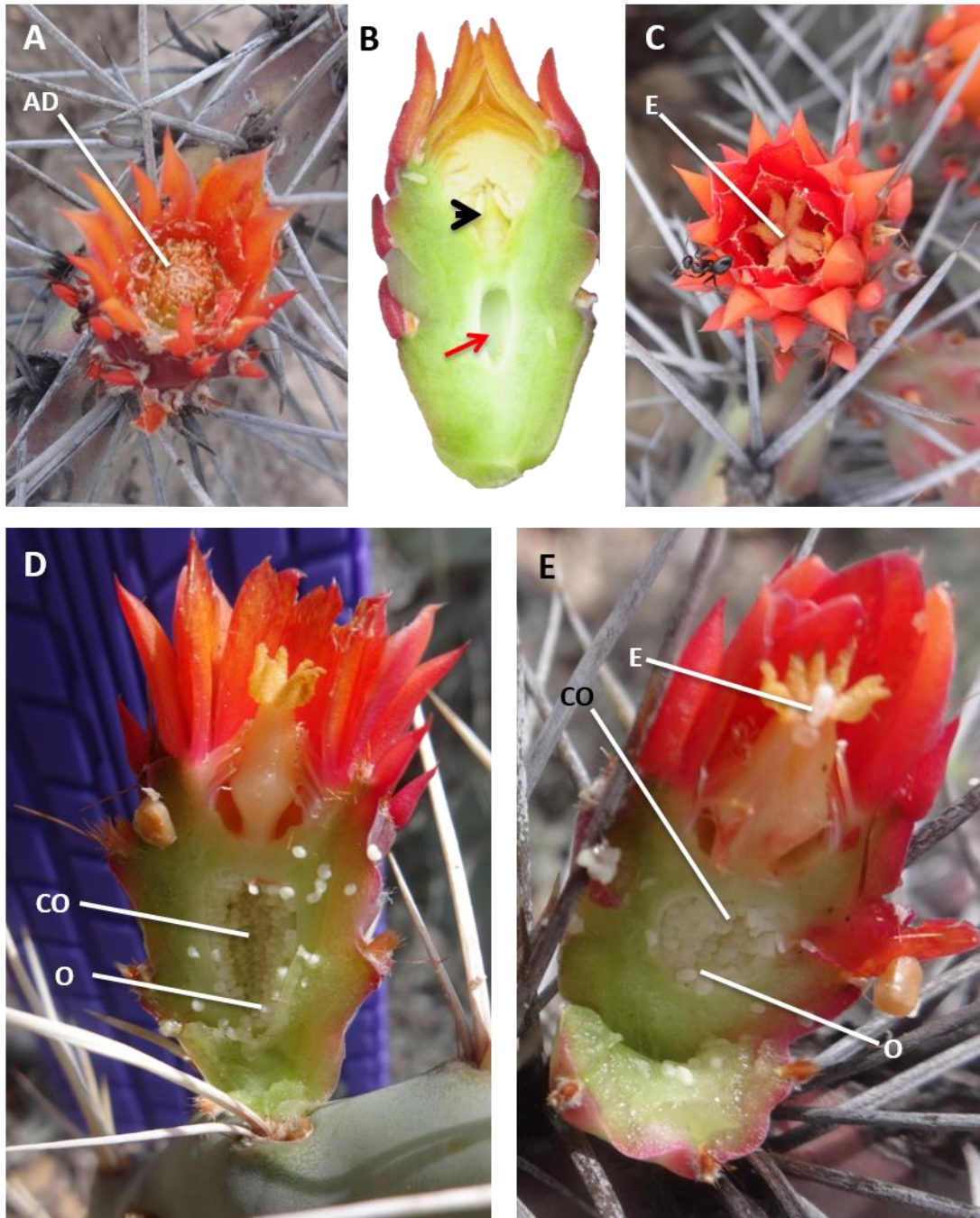


Figura 5. Flores masculinas y femeninas. A. Flor masculina en antesis mostrando las anteras dehiscentes. B. Botón floral masculino mostrando la carencia de óvulos, estigma y una cavidad ovárica reducida. C. Flor femenina mostrando los lóbulos estigmáticos extendidos. D. Corte longitudinal de flor femenina al momento de la antesis. E. Corte longitudinal de flor femenina aproximadamente 3-4 días posteriores a la antesis con óvulos fecundados. AD= anteras dehiscentes; CO= cavidad ovárica; E= estigma; O= óvulos.

Óvulos de las flores femeninas

Los óvulos son crasinucelados, bitégmicos y campilótrofos lo cual implica que existe una curvatura en la nucela y en el saco embrionario. Durante el desarrollo del óvulo se distinguen dos zonas del funículo, la más proximal a la placenta es alargada y libre, y la parte distal (más cercana a la nucela y a los tegumentos) va envolviendo al óvulo en desarrollo, a esta condición se le conoce como funículo circinótrofo. La placenta presenta algunas células papilosas (Fig. 6A).

La parte distal del funículo también se extiende lateralmente y sus márgenes se fusionan cubriendo a los tegumentos. La parte proximal a la nucela es casi cilíndrica, pero en su parte ventral es acanalada y en esa zona se distingue una epidermis de células alargadas y papilosas, lo cual ocurre desde su inserción a la placenta hasta la zona que se ubica cercana al micrópilo (Fig. 6B). El funículo circinótrofo envuelve al óvulo dando una vuelta completa alrededor de los tegumentos aún en desarrollo, inicia en la región hilo-micropilar y después de dar una vuelta completa vuelve a ubicarse en esa región, de tal manera que el micrópilo en un óvulo maduro vuelve a quedarse en cercanía a la zona donde se inició y queda protegido por la cubierta funicular (Fig. 6C, 6D). Se realizó un conteo de óvulos de 16 ovarios de diferentes individuos femeninos, y se obtuvo un promedio de 168.87 óvulos por ovario (Fig. 6E).

Los dos tegumentos del óvulo son biestratificados y rodean a una nucela formada por 8-10 estratos de células parenquimáticas que rodean al saco embrionario (Fig. 6D, 7A). Un haz vascular entra en el funículo desde el tejido placentario y continua hasta la región calazal. Dentro del megagametofito maduro tres de las células se ubican en el extremo micropilar, dos prominentes sinérgidas y una ovocélula (gametofito femenino) formando el aparato ovocelular (Fig. 7B). Las tres antípodas se ubican en el extremo calazal y degeneran tempranamente (Fig. 7C). Los dos núcleos polares de la célula central se fusionan y se observan rodeados de granos de almidón (Fig. 7D). Durante la fecundación el tupo polínico entra a una de las sinérgidas del aparato ovocelular para descargar las células espermáticas (Fig. 7E).

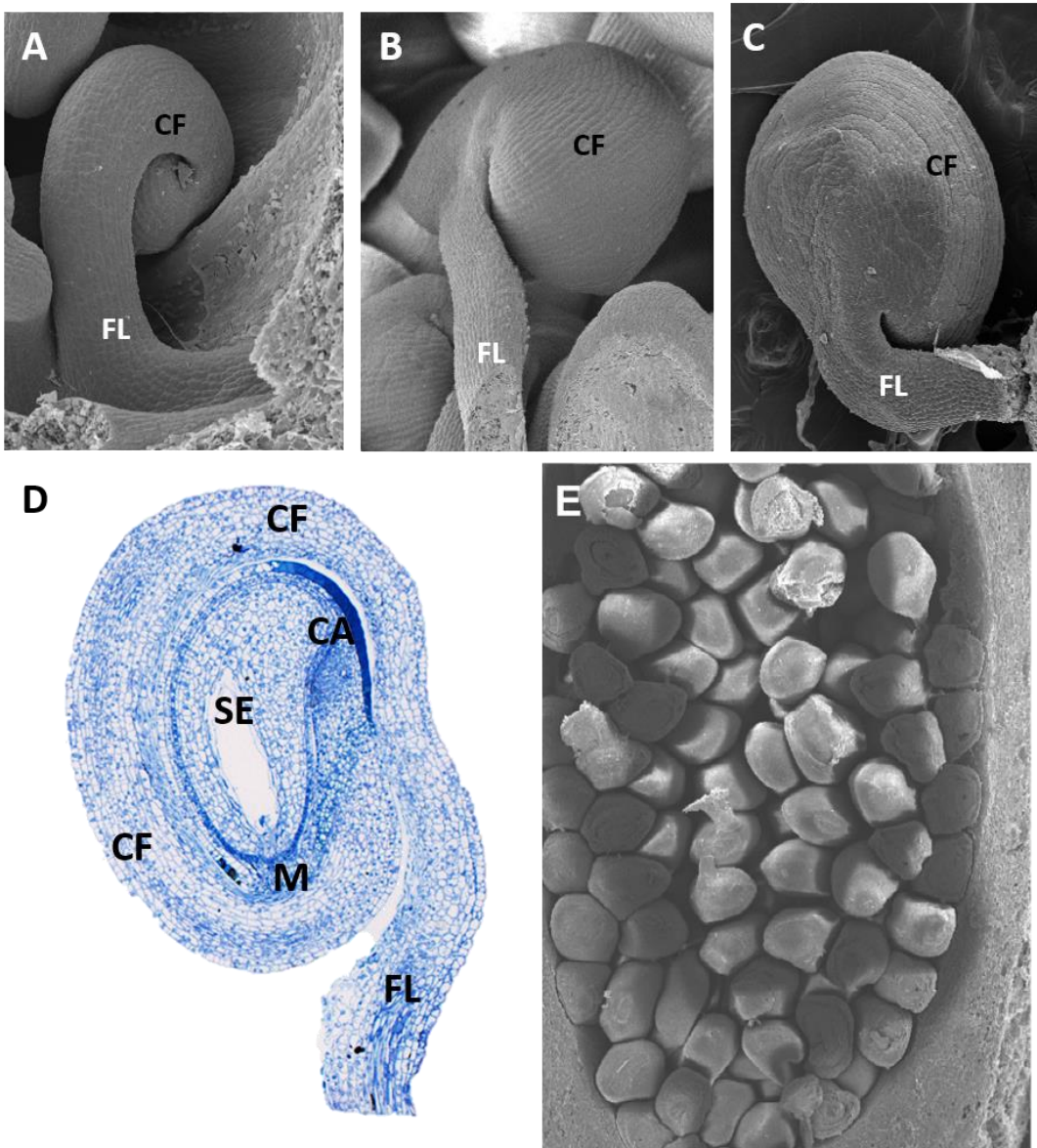


Figura 6. Desarrollo del óvulo y formación temprana de la cubierta funicular. **A.** Óvulo joven con funículo alargado y libre en la zona proximal (unión a la placenta) y la zona distal del funículo que va cubriendo a los tegumentos y a la nucela. **B.** Óvulo en etapa intermedia con fusión lateral de la zona distal del funículo y tricomas papilosos de la zona ventral. **C.** Óvulo maduro con cubierta funicular y zona libre del funículo **D.** Óvulo maduro campilótropo, bitégmico con nucela abundante y con cubierta funicular. **E.** Ovario maduro de flor femenina con abundantes óvulos. CA= cálaza; CF= cubierta funicular; FL= Funículo libre; M= micrópilo; SE= saco embrionario.

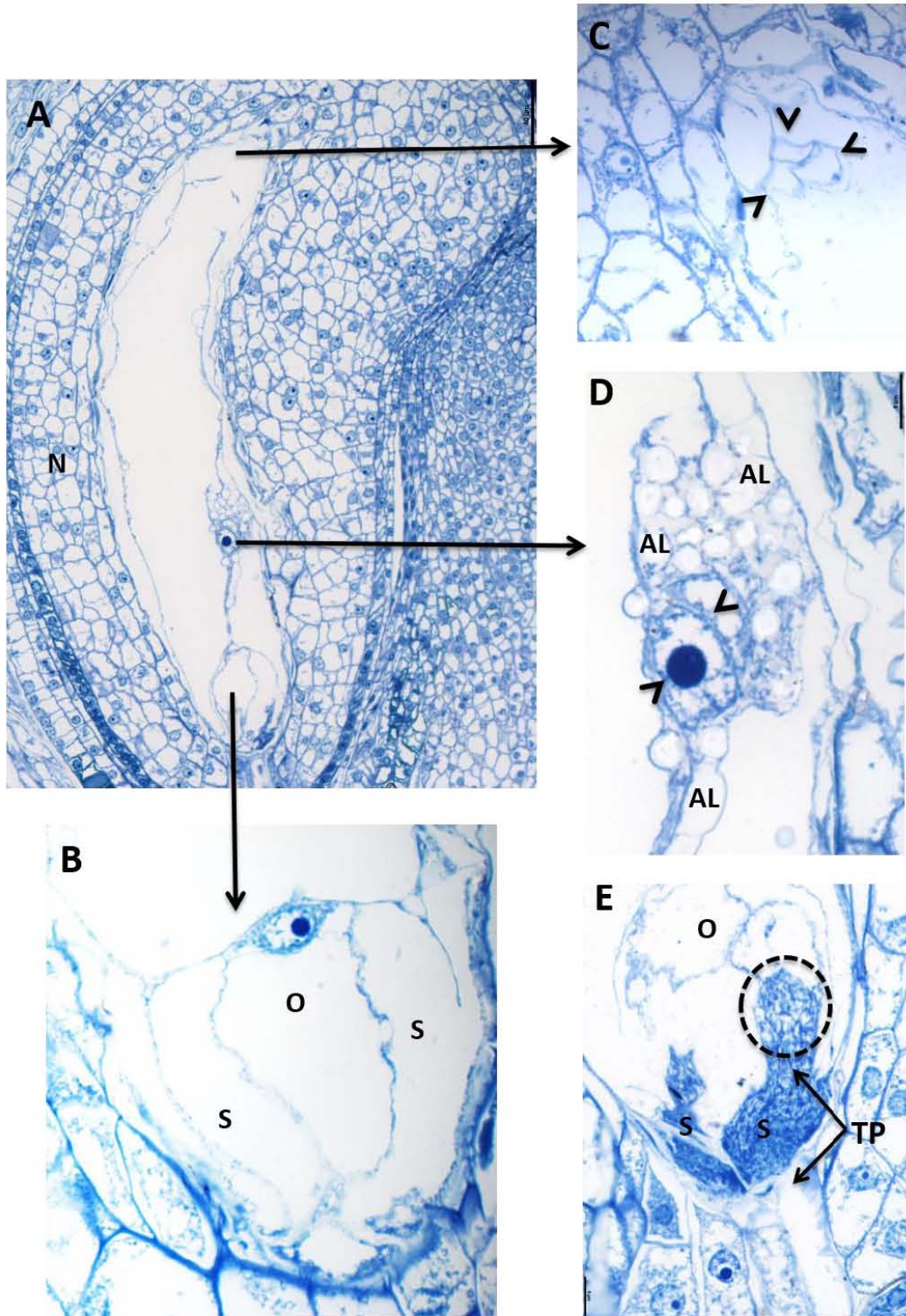


Figura 7. Saco embrionario. A-D. En antesis. E. Durante la fecundación. **A.** Saco embrionario curvo rodeado de nucela. **B.** Acercamiento de la ovocélula con dos sinérgidas. **C.** Acercamiento de antípodas en degeneración (cabezas de flecha). **D.** Núcleos polares (cabezas de flecha) rodeados con granos de almidón. **E.** Entrada y descarga de tubo polínico en una sinérgida durante la fecundación. AL=Almidón; N= Nucela; O= Ovocélula; S= Sinérgidas; TP= Tubo polínico.

Cambios morfológicos y de coloración durante el desarrollo de frutos y semillas

En los meses de mayo a junio, se observó que los frutos que se encuentran sobre los individuos femeninos de *O. stenopetala* (Fig. 8A) sirven de alimento (Fig. 8B) a diversos roedores y ganado caprino, asnos y caballos. Las flores masculinas no producen frutos, se marchitan después de la antesis (Fig. 8C) y caen posteriormante de la planta o también son consumido por los animales locales.



Figura 8. Plantas masculinas y femenina de *Opuntia stenopetala* en etapa de fructificación. **A.** Frutos en desarrollo. El número 1 muestra cladodios maduros, las aréolas con espinas blancas y carentes de hojas; el número 2 muestra un cladodio joven con hojas rojas en las aréolas; el número 3 muestra frutos maduros y globosos. **B.** Frutos maduros comidos. **C.** Planta masculina mostrando flores que han pasado la antesis y comienzan a marchitarse (flecha).

En etapa temprana del desarrollo los frutos son globosos, y se van alargando durante el desarrollo. Cuando son maduros miden 5 cm de largo y 4.5 cm de ancho, son de color rojo-púrpura, poseen pequeñas aréolas prominentes, glóquidas de color rojo-anaranjado y algunas espinas delgadas de 1 a 2.5 cm de largo, de blancas a rojizas.

Durante el desarrollo de las semillas la parte libre de los funículos es incolora y translúcida (Fig. 9A-D), pero conforme avanzan hacia la madurez las semillas se van volviendo oscuras debido a la presencia de taninos (se explicará más adelante) tanto en la parte interna de la cubierta funicular como en la exotesta. También va aumentando el tejido blando y jugoso de la parte externa de la cubierta funicular y de la zona proximal de los funículos que quedan libres, los cuales van cambiando de coloración hasta alcanzar un rojo-púrpura intenso (Fig. 9E-G). El sabor es agridulce, tanto los funículos como la parte interna del pericarpelo son jugosos (Fig. 9H).



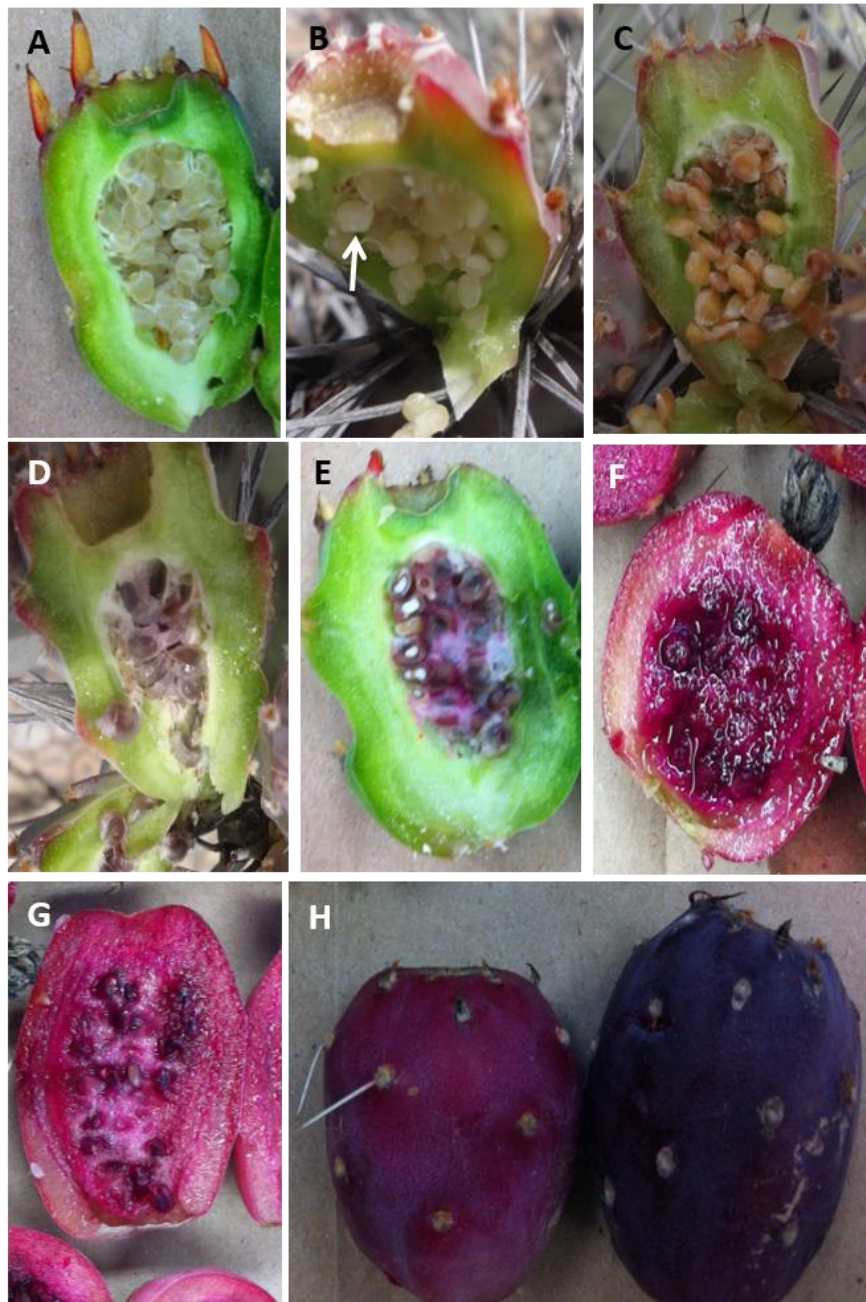


Figura 9. Cambios durante el desarrollo del fruto y las semillas. A-D. Frutos jóvenes. **E-G.** Frutos en etapa intermedia. **H.** Frutos maduros. **A-B.** Frutos con semillas incoloras y traslucidas. **C-D.** Frutos con semillas que van cambiando de color por el depósito de taninos en la cubierta seminal y funicular, mientras que la zona libre de los funículos es incolora. **E-G.** Frutos con semillas cuya cubierta funicular se vuelve oscura, mientras que la zona libre de los funículos y la pared interna del fruto se van tornando de color púrpura. **H.** Frutos maduros de color púrpura, las espinas de las aréolas se caen generalmente.

Polinizaciones controladas

Los tres tratamientos de polinización realizados en campo: polinización natural (control), polinización manual y apomixis formaron frutos, aunque este último fue corroborado porque se detectaron insectos que entraron a través de las bolsas de tul (Tabla 2. Fig. 10), lo cual implica que las semillas de *Opuntia stenopetala* se forman por un proceso sexual y por apomixis (asexual), aunque esta última en menor grado (se explica más adelante).

Tratamientos de polinización abierta natural (control). En este tratamiento no se manipularon las flores, sólo se etiquetaron y se esperó la formación de los frutos. Este tratamiento presentó el menor número de semillas desarrolladas de todos los tratamientos, el cual en promedio fue de 48.12 ± 5.43 semillas por fruto, en contraste con los 168 óvulos en promedio que tiene una flor. Cabe resaltar que varios de los frutos fueron comidos total o parcialmente por consumidores naturales, como burros, cabras, caballos y roedores antes de colectarlos. De las 30 flores de este tratamiento, sólo se lograron colectar 24 frutos completos, el resto no fueron considerados para el conteo (Tabla 2. Fig. 10).

Tratamiento de polinización cruzada manual (entrecruza). En este tratamiento se formó el mayor número de semillas. En promedio 147.54 ± 13.14 semillas por fruto, lo cual es muy cercano a los 168 óvulos que se forman en promedio por cada ovario. En este caso también hubo consumo de frutos y de las 30 flores tratadas, sólo se lograron colectar 22 frutos completos, el resto no fueron considerados para el conteo (Tabla 2. Fig. 10).

Tratamiento de apomixis en campo: de las 33 flores de este tratamiento, 13 formaron frutos y produjeron semillas (Tabla 2. Fig. 10). Debido a que no se excluyó totalmente la visita de varios insectos que lograron meterse a las bolsas, se formaron algunos frutos, lo cual no se esperaba. Lo anterior llevó a la aplicación del Tratamiento de apomixis en invernadero (párrafo siguiente). En aquellos frutos que sí formaron semillas el promedio por fruto fue de 76.46 ± 21.05 , mayor que el control, pero menor que la polinización manual.

Tratamiento de apomixis en invernadero. De los cladodios colectados en campo y mantenidos en el invernadero de la Facultad de Ciencias se revisaron 40 flores, las cuales no formaron frutos (Tabla 2), lo cual indica, que las semillas de *O. stenopetala*, tienen un origen sexual, es decir, necesitan el polen de las flores masculinas, descartando un proceso apomítico.

Tabla 2. Resultados de tratamientos de polinización controlada.

Tratamiento	Flores tratadas	Frutos formados	# de Frutos analizados	Promedio \pm ee de semillas por fruto
Polinización Abierta Natural (Control)	30	30 100%	24	48.12 \pm 5.43
Polinización Cruzada Manual (Entrecruza)	30	30 100%	22	147.54 \pm 13.14
Apomixis en campo	33	13 39.39%	13	76.46 \pm 21.05
Apomixis en invernadero	40	0	-	-

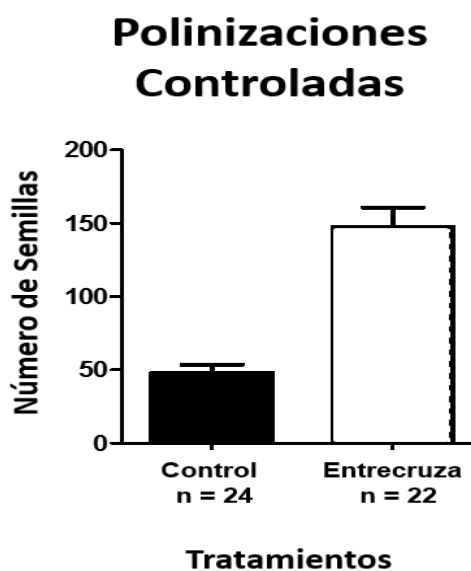


Figura 10. Gráfica de las polinizaciones controladas mostrando error estándar del tratamiento control y entrecruza. El tratamiento de apomixis en invernadero no produjo semillas ni frutos.

La polinización cruzada es obligada para la formación de frutos debido a que es una especie dioica y las flores que producen polen están separadas de las que forman óvulos. La comparación entre el tratamiento control (sin manipular) y la polinización cruzada manual indican que la polinización en la población de *O. stenopetala* es poco eficiente, ya que en el control se obtuvieron menos semillas que cuando se adicionó manualmente el polen. En el tratamiento de apomixis en campo, la mayoría de las flores se marchitaron una semana posterior a la antesis porque no formaron ninguna semilla (Fig. 11A-B).



Figura 11. Flores colapsadas y ovarios vacíos del tratamiento de Apomixis realizado en campo.

Desarrollo de las semillas

Embriogénesis

Después de la fecundación (Fig. 7E) se forma un cigoto y el núcleo primario del endospermo. El núcleo primario del endospermo inicia su primera división antes que el cigoto, el cual entra en latencia, mientras los núcleos del endospermo proliferan. En esta etapa todavía se observan restos de las sinérgidas (Fig. 12).



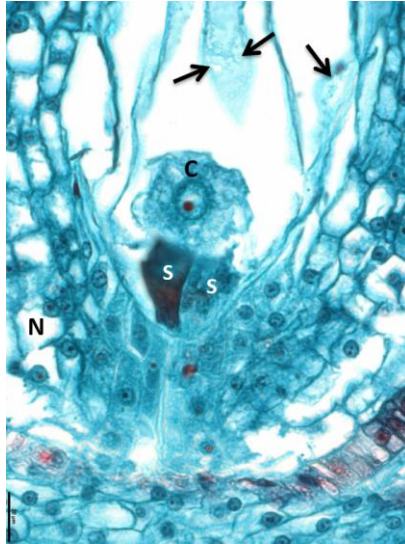


Figura 12. Óvulo fecundado, mostrando el cigoto, las sinérgidas degenerando y los primeros núcleos del endospermo (flechas). C= cigoto; N= Nucela; S= Sinérgidas.

La primera división del cigoto es transversal, formando una célula apical y otra basal. Cada célula se vuelve a dividir transversalmente varias veces, originando un proembrión columnar de dos hileras de células de grosor, la parte apical es más ensanchada y redondeada, mientras que las células basales formarán el suspensor. El embrión se encuentra rodeado por endospermo nuclear y perispermo (Fig. 13A-B). En esta etapa se observa separado el funículo libre de la cubierta funicular (en corte longitudinal de semilla), se observan drusas en el funículo. También se observa una separación entre el tegumento externo y la cubierta funicular (Fig. 13A).

En etapas tempranas de la embriogénesis la semilla es aún alargada, la cubierta funicular se observa con espacios entre el funículo circundante y la cubierta de la semilla (Fig. 13A).

Las células apicales del proembrión experimentan divisiones en varios sentidos formando un embrión globular, mientras que en las basales ocurren pocas divisiones transversales y algunas longitudinales para formar un suspensor lineal, pero con una base ligeramente amplia. El embrión globular en un principio se encuentra rodeado por endospermo nuclear (Fig. 13C-D).

Posteriormente, en etapa avanzada del embrión globular, alrededor de cada núcleo endospermico se forma pared celular, convirtiéndose en endospermo celular alrededor del embrión, mientras que en el resto del saco embrionario es nuclear (Fig. 13E). En esta etapa aparece la hipófisis en la zona entre la base del cuerpo del embrión; y el suspensor y la protodermis alrededor del cuerpo del embrión globular es evidente (Fig. 13F).

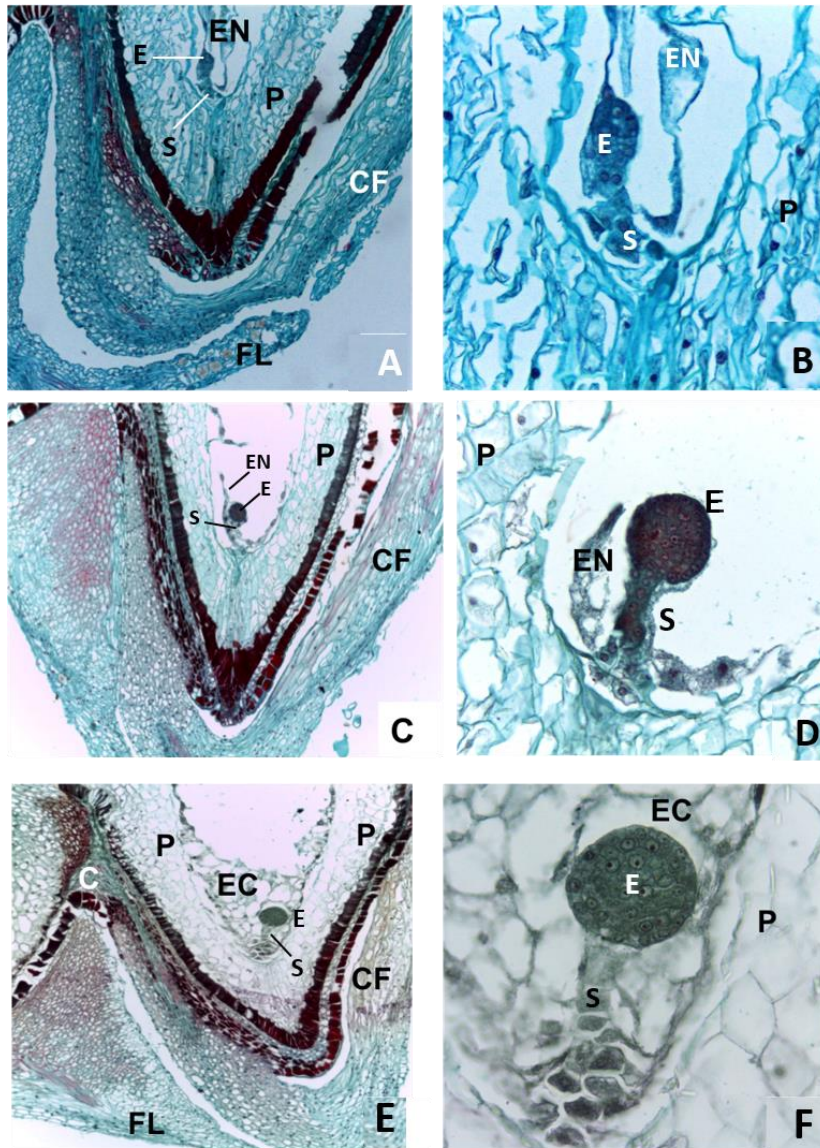


Figura 13. Embriogénesis temprana. A-B. Desarrollo temprano de la semilla, se observa al embrión columnar. C-D. Semilla en etapa de embrión globular joven rodeado por endospermo nuclear y perispermo. E-F. Semilla con embrión en etapa globular avanzada rodeado por endospermo celular y perispermo. C= Cálaza, CF= Cubierta funicular, E= Embrión, EC= Endospermo celular, EN= Endospermo nuclear, FL= Funículo libre, P= Perispermo S=Suspensor.

La semilla va tomando un aspecto más redondeado debido a la elongación de las células de la cubierta funicular y la cubierta de la semilla, haciéndose una semilla anfítropa (Fig. 14A) con respecto a la campilótropa que parecía en sus primeras etapas de desarrollo (Fig. 13A, 13C). Lo anterior provoca que el saco embrionario donde ahora se desarrolla el endospermo luzca con mayor curvatura, en forma de U invertida, en cuyo centro se ubica la cálaza (Fig. 14A).

En el ápice micropilar se ubica un embrión del cual comienzan a surgir los dos cotiledones, adquiriendo una forma de corazón, con un incipiente meristemo apical entre ellos y en la zona opuesta se está formando el futuro meristemo radicular, zona que se encuentra unida aún al suspensor (Fig. 14B). Posteriormente el hipocótilo del embrión se elonga, pasando por la etapa de torpedo. En esta etapa se distingue el hipocótilo de lo que será la radícula, pero aún aparece el suspensor, aunque éste luce colapsado. El endospermo alrededor del embrión va consumiéndose (Fig. 14C-D). Un canal de agua (considerando la descripción de Orozco-Segovia *et al.*, 2007, para *Opuntia tomentosa*), se observa en la parte blanda del funículo, correspondiente a la zona donde inicia el funículo libre (Fig. 14C).

Tanto el hipocótilo, radícula y cotiledones se van elongando y curvando dentro del gran saco embrionario. El embrión completo tiene forma de U (Fig. 14F).

En el extremo micropilar se ubica la radícula con una cofia evidente (Fig. 15A); sobre la radícula un hipocótilo cilíndrico y elongando. En el otro extremo se ubica un reducido meristemo apical y dos largos cotiledones (Fig. 15B); tanto los cotiledones como el hipocótilo contienen almidón. El endospermo se ha consumido considerablemente, sin embargo, quedan algunos estratos alrededor de todo el embrión, el perispermo sólo se ubica en la zona calazal, cercano al meristemo apical del embrión y a los cotiledones. En la cálaza y alrededor de la radícula el endospermo es ligeramente abundante (Fig. 14F).

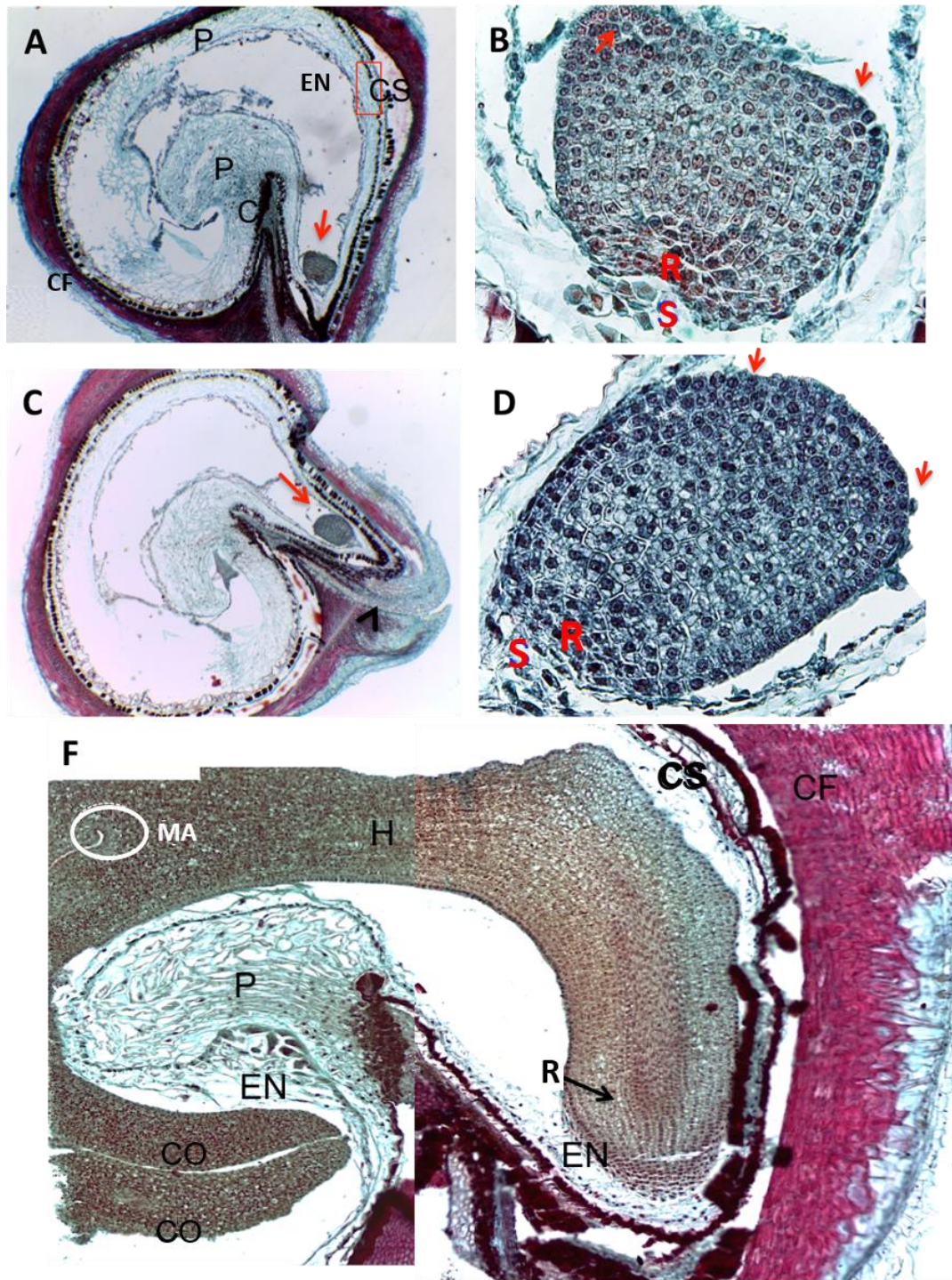


Figura 14. Embriogénesis avanzada. **A.** Etapa de embrión en forma de corazón (flecha), **B.** Acercamiento al embrión acorazonado rodeado de endospermo que va consumiéndose, se observa el inicio de cotiledones (flechas) y radícula, el suspensor colapsado. **C-D.** Embrión de torpedo con mayor desarrollo de radícula y cotiledones (flecha), se observa el canal de agua (cabeza de flecha). **F.** Embrión cotiledonario curvo, con abundante perispermo. C= cálaza; CF= cubierta funicular; CO= cotiledones; CS= cubierta seminal; E= embrión; EN= endospermo; FL= funículo libre; H= hipocótilo; MA= meristemo apical; P= perispermo; R= radícula; S= suspensor.

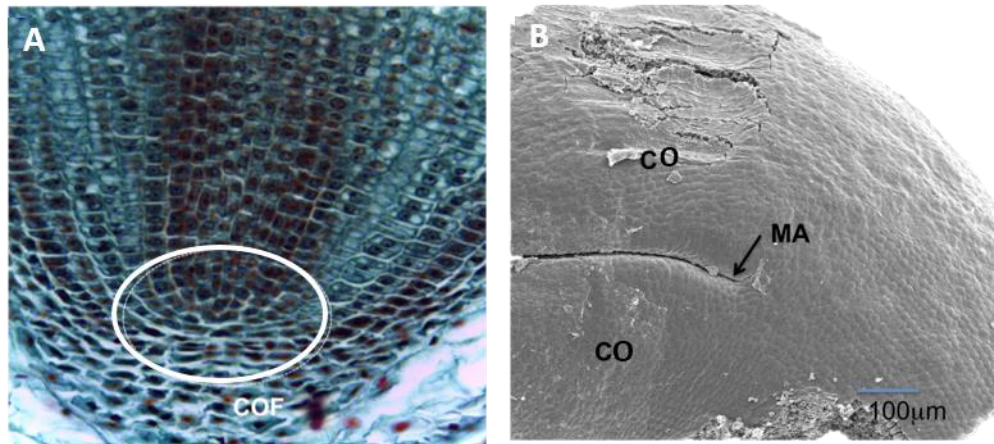


Figura 15. Meristemas apicales del embrión. A. Meristemo apical del embrión entre los dos cotiledones. B. Meristemo radicular (círculo). CO= Cotiledón; COF= Cofia; MA=, Meristemo apical.

Endospermogénesis

El desarrollo del endospermo de *O. stenopetala* es de tipo nuclear. Durante las primeras divisiones de los núcleos del endospermo, varios migran hacia la cálaza, donde forman un dominio, con características de desarrollo diferentes a los núcleos de la zona micropilar y lateral del saco embrionario. Los núcleos de la cálaza son más grandes y forman un sincicio (endospermo con núcleos compartiendo un citoplasma abundante), el citoplasma que los rodea es muy denso y tiene apariencia haustorial hacia el tejido de la nucela que se encuentra cercana en la cálaza (Fig. 16A-C), mientras que los que se encuentran en el resto del saco embrionario son núcleos que tienen poco citoplasma a su alrededor (Fig. 16B). Finalmente, todos los núcleos terminan rodeados de pared celular (Fig. 13F), incluso los ubicados en la cálaza (Fig. 16D), y el endospermo se vuelve del tipo celular y es vacuolado.



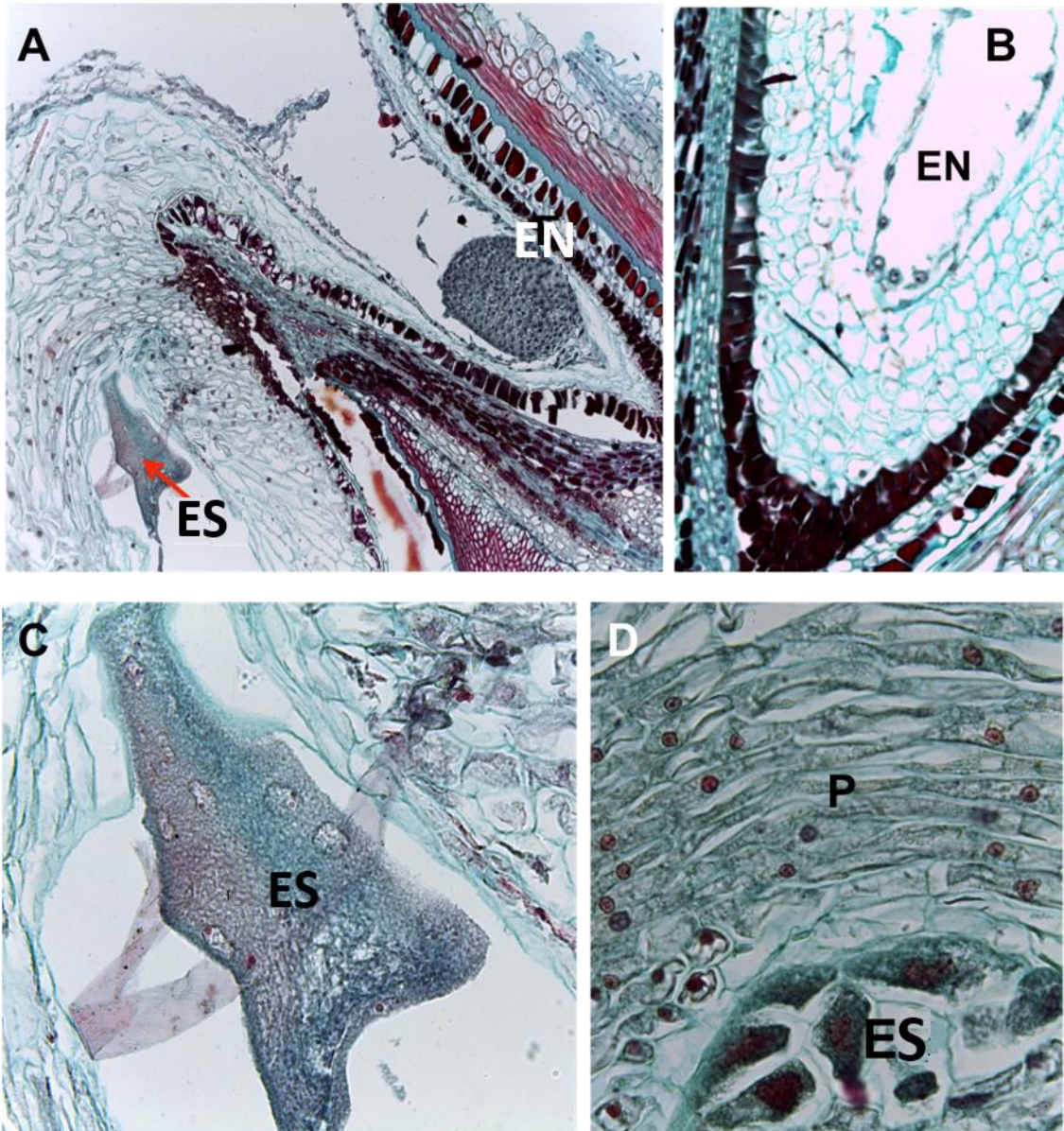


Figura 16. Dominios del endospermo durante el desarrollo. **A.** Endospermo nuclear y sincicial del dominio calazal. **B.** Endospermo en etapa nuclear en el resto del saco embrionario. **C.** Acercamiento al endospermo sincicial. **D.** Acercamiento al endospermo del dominio calazal en su etapa celular, rodeado de perispermo. ES= endospermo sincicial; EN= endospermo nuclear; P= perispermo.

Desarrollo de la cubierta seminal y cubierta funicular

Durante la antesis el óvulo de *O. stenopetala* es bitégmico. Ambos tegumentos son biestratificados, a excepción de la zona micropilar, donde pueden alcanzar tres estratos cada uno. En antesis ambos tegumentos tienen células parenquimáticas (Fig. 6D). En *Opuntia* destaca la presencia de una cubierta adicional formada por el funículo circundante o circinótropo de acuerdo a la terminología de Flores y Engleman (1976) llamada cubierta funicular, la cual se observa en la figura 6D formada por células parenquimáticas (excepto el haz vascular).

Una vez que ocurre la fecundación de la ovocélula, el tegumento interno da lugar al tegmen y el tegumento externo a la testa y en conjunto forman la cubierta seminal. Por su parte la cubierta funicular comienza a presentar cambios, las células de la epidermis dorsal comienzan a elongarse en sentido perpendicular a la semilla, mientras que las células papilosas y alargadas (de la epidermis ventral del funículo) por donde pasa el tubo polínico comienzan a colapsarse (Fig.17A).

La cubierta funicular cubre por completo a la cubierta seminal, formada por testa y tegmen y ambas son biestratificadas (Fig. 17B). Las células de la epidermis dorsal de la cubierta funicular se elongan considerablemente cuando las de la epidermis ventral se han colapsado y adherido a la exotesta (Figs. 17C, 18A).



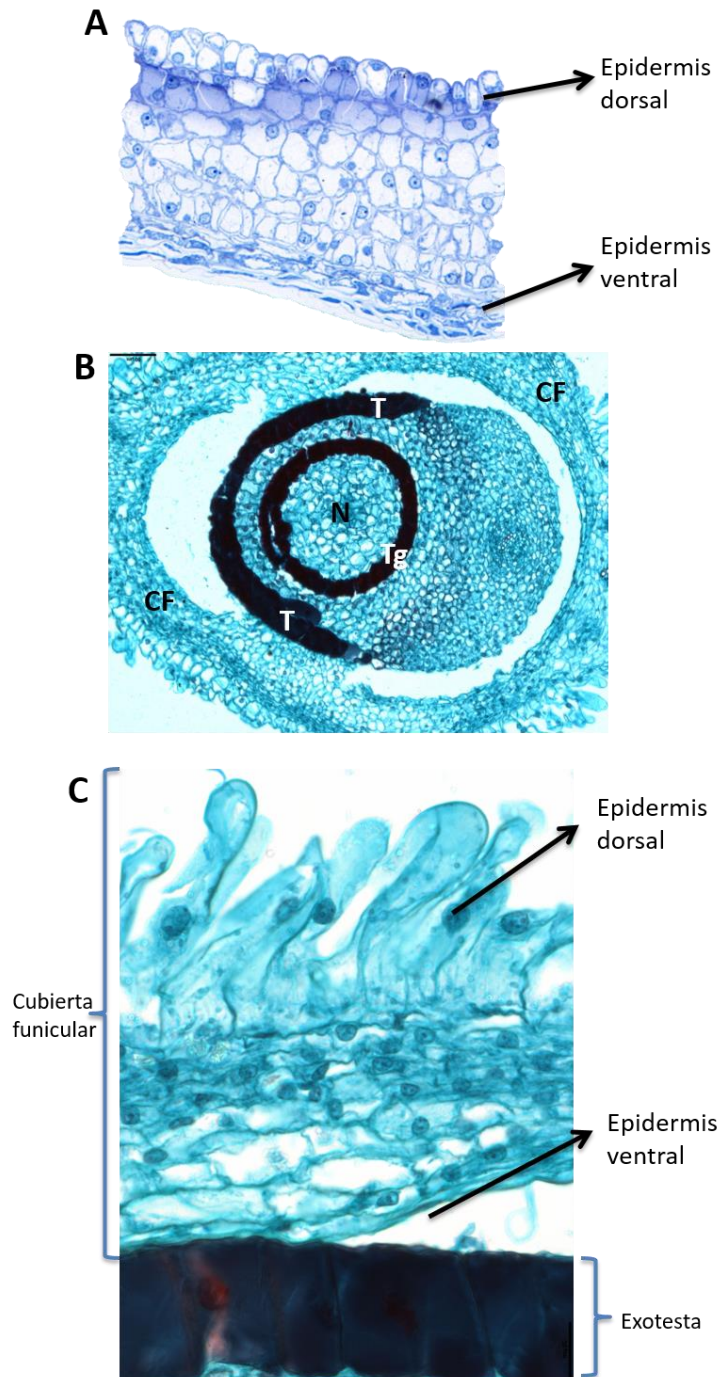


Figura 17. Cambios en la cubierta seminal y la cubierta funicular inmediatos a la fecundación. A. Cubierta funicular mostrando alargamiento de las células de la epidermis dorsal, los tricomas de la epidermis ventral se colapsan después del paso de los tubos polínicos; el resto de las células son parenquimáticas. **B.** Corte transversal de semilla joven mostrando la fusión de las partes laterales del funículo. **C.** Acercamiento a la cubierta funicular mostrando el alargamiento de la epidermis dorsal, la desaparición de la epidermis ventral y adherida a la exotesta.

La testa de la semilla está formada por exotesta y endotesta uniestratificadas. La exotesta contiene taninos en la mayoría de sus células, la endotesta es parenquimática. El tegmen está formado por un exotegmen uniestratificado de células parenquimáticas y un endotegmen con taninos, este último en contacto con el perispermo (Fig. 18A).

Conforme avanza el desarrollo el exotegmen parenquimático se pierde y el endotegmen a pesar de contener taninos se va colapsando, mientras permanece aún la endotesta parenquimática. En esta etapa la capa que se engrosa considerablemente es la exotesta, cuyas células contienen abundantes taninos y una pared externa muy gruesa (Fig. 18B), de tal manera que la cubierta mecánica es la exotesta, de acuerdo a Corner (1976) la semilla de *Opuntia stenopetala* es exotestal.

La cubierta funicular también presenta cambios considerables, la mayoría de sus células se van lignificando y tiene tres zonas distinguibles. La zona más interna del funículo es la más cercana a la testa, tiene células con paredes primarias redondeadas, pero que van engrosándose y lignificándose, semejantes a esclereidas en desarrollo (Fig. 18C,19A-B).



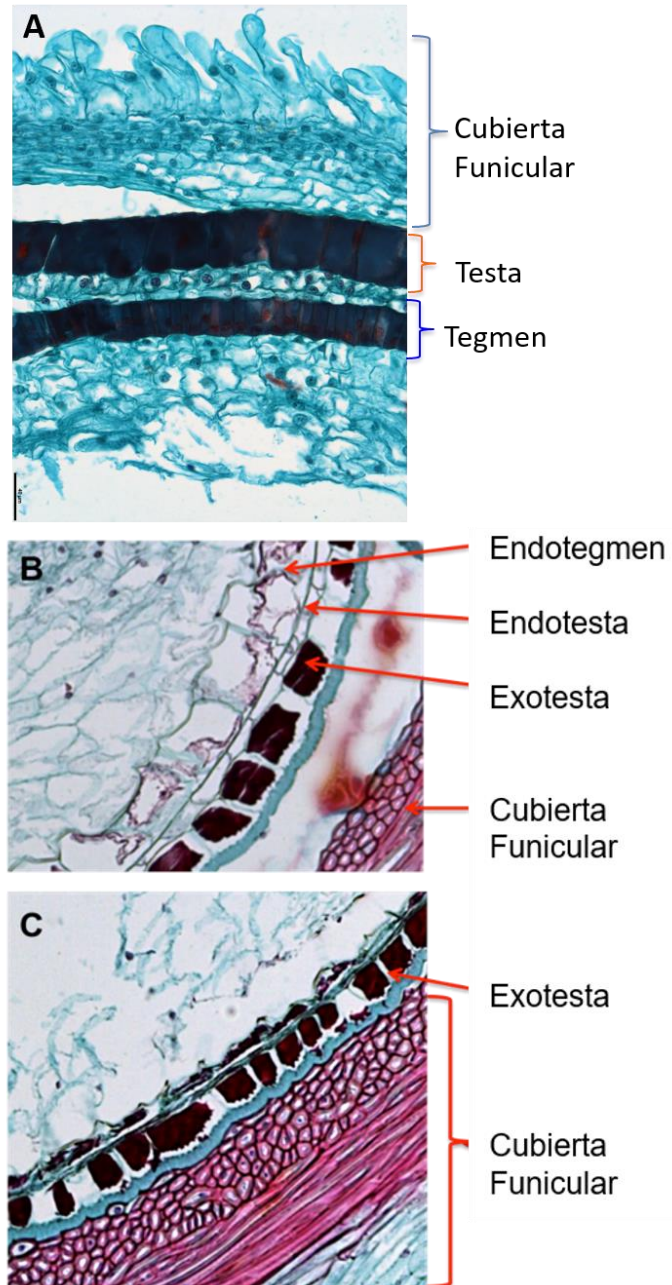


Figura 18. Cambios en la cubierta seminal y la cubierta funicular. **A.** Etapa joven, la testa y tegmen son biestratificados. **B.** Etapa intermedia donde ha desaparecido el exotegmen en la cubierta seminal y la cubierta funicular va lignificándose internamente. **C.** Etapa madura, la cubierta seminal formada sólo por una gruesa exotesta y cubierta funicular con estrato interno e intermedio de células engrosadas.

La parte externa del funículo está formada por células parenquimáticas con vacuolas grandes y epidermis papilosa, es una zona blanda, que forma parte de la pulpa del fruto y se puede desprender fácilmente de la semilla. Las dos capas pluriestratificadas están separadas por la parte central, la cual alberga al haz vascular que recorre todo el funículo hasta llegar a la cálaza (Fig. 19A-B). Las capas interna e intermedia de la cubierta funicular presentan mayor engrosamiento, mientras que la externa sigue siendo parenquimática. La zona interna en corte longitudinal con células orientadas perpendicularmente a la semilla, la zona media con células elongadas paralelamente al eje mayor de la semilla, con células fibrilares que se enlazan entre ellas, pero la zona externa con células parenquimáticas y células epidérmicas papilares (Fig. 19B).

Morfología de semillas maduras al Microscopio Electrónico de Barrido

Las semillas maduras de *O. stenopetala*, son pequeñas, lisas y de forma acorazonada, miden 3-5 mm de diámetro y tienen 3 mm de espesor, el color es amarillo-café, y están recubiertas con un arilo (Fig. 20A-D). En algunas semillas, se llegó a encontrar más de un embrión (Fig. 20E), sin embargo, al momento de que la semilla germinara, solo emergía una plántula (Fig.20F).



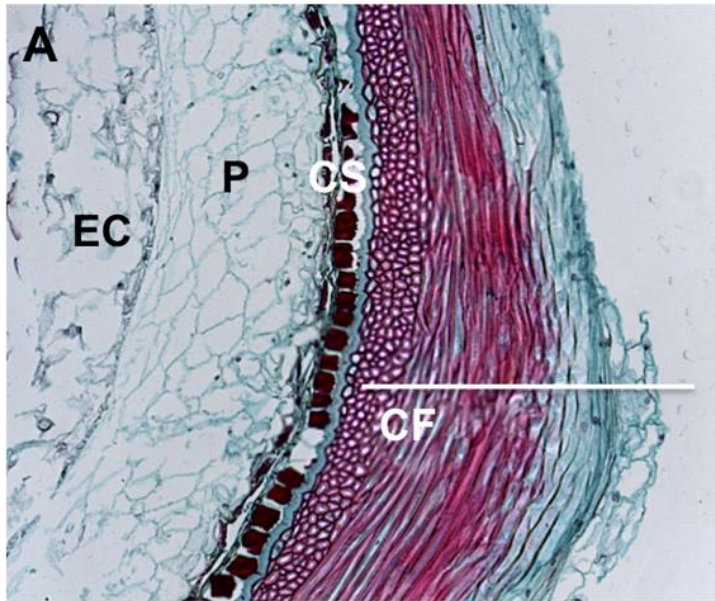


Figura 19. Detalles de la cubierta seminal y cubierta funicular. A. Cubierta funicular con todas sus partes, rodeando la cubierta seminal uniestratificada, al perispermo y al endospermo celular. **B.** Acercamiento a la zona interna (ventral), haz vascular y zona intermedia de la cubierta funicular donde varias de las células fibrilares se entrelazan. CS= cubierta funicular; CS= cubierta seminal; EC= endospermo celular; HV= haz vascular; P= perispermo.

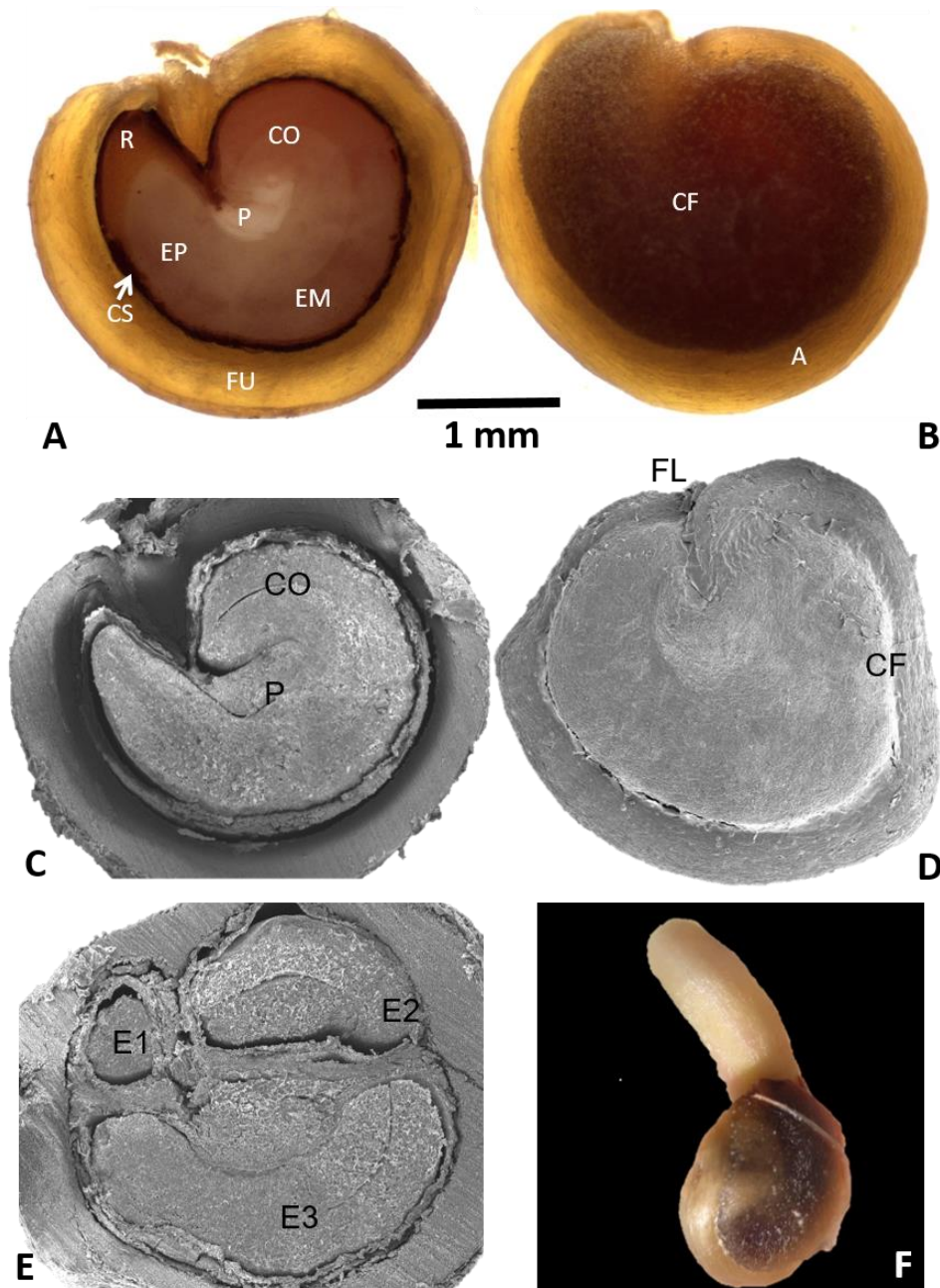


Figura 20. Semilla madura de *Opuntia stenopetala*. A-B Semillas en corte longitudinal. A. Parte interior, mostrando al embrión, perispermo, cubierta seminal y funículo formando un arilo. B. Parte exterior, mostrando la cubierta funicular lignificada. C. Semilla vista al MEB mostrando el embrión y perispermo. D. Vista superficial de la semilla con células papilosas de la epidermis de la cubierta funicular. E. Semillas con tres embriones. F. Semilla germinada. A= arilo lignificado; CO= cotiledones; CF= cubierta funicular; CS= cubierta seminal; EP= epicótilo del embrión; FU= funículo; FL= funículo libre; P= perispermo; R= radícula.

DISCUSIÓN

Los frutos de *O. stenopetala* son de sabor agridulce (tuna), de color rojo-púrpura, generalmente de forma globosa (5 cm de largo por 4.5 cm de ancho), como lo reportado para *Opuntia cantabrigiensis*, *O. hyptiacantha*, *O. nigrita*, *O. tomentosa*, *O. robusta* y *O. streptacantha* (Rosas, 2013). El fruto presenta pocas espinas delgadas debido a que muchas se caen durante la maduración del fruto y desaparición de los tubérculos, esta caída también se reporta para tunas de *O. engelmanni* y *O. ictERICA* y posee glóquidas de color rojo-anaranjado como las presentadas en *O. hyptiacantha*, *O. lasicantha* y *O. sarca* (Rosas, 2013).

En los frutos de *O. stenopetala*, la parte comestible y digerible la componen los tejidos blandos y parenquimáticos de los funículos libres (parte proximal a la placenta) y la parte externa de la cubierta funicular, lo cual coincide con otras especies como *O. tomentosa* (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). Asimismo, parte de la pulpa también forma la parte interna de la placenta, específicamente la epidermis interna del pericarpelo, la cual se vuelve papilosa después de la fecundación de los óvulos (Pimienta, 1990), como en *O. amyclaea* (Mejía y Cantwell, 2003), a diferencia de los xoconostles, que son frutos considerados como secos o semisecos en especies del género *Opuntia* (como *O. duranguensis*, *O. guilanchi*, *O. joconostle*, *O. leucotricha*, *O. oligacantha*, entre otras). Los xoconostles carecen de pulpa, y la pared del ovario es carnosa y ácida, sus semillas tienen funículos delgados con poca proliferación de los tejidos blandos e incluso producen poca azúcar. Estos frutos pueden permanecer de uno a tres años sobre los cladodios (Scheinvar *et al.*, 2010; Rosas, 2013).

Los óvulos de varias especies de la familia Cactaceae se han descrito como anátropos (*Opuntia aurantiaca*, Archibald, 1939; *Opuntia* sp., Bhojwani y Bhatnagar, 1974; *Nopalea serpentinus*, Flores y Engleman, 1976); campilótropos (en *Cereus jamacaru*, Kapil y Prakash, 1969; *Opuntia tomentosa*, Flores, 2002); circinótropos (en *Opuntia aurantiaca*, Archibald, 1939; *O. dillenii*, Tiagi, 1954 y Maheshwari y Chopra, 1955); anfítropos (Archibald, 1939; Tiagi, 1954; Maheshwari y Chopra, 1955) hemircinótropos (en *Mammillaria tenuis*, Tiagi,

1957) debido a las vueltas que da el funículo alrededor del óvulo. Para representantes de la subfamilia Cactoideae el funículo se adhiere al micrópilo, pero nunca lo envuelve ni se fusiona en sus extremos laterales como ocurre para todos los miembros de Opuntioideae (lo cual también ocurre en *O. stenopetala*). Los términos campilótropo, circinótropo, hemicircinótropo y anfítropo resultan controversiales porque no existe consenso en cuanto la curvatura de la nucela, saco embrionario y tegumentos en los óvulos/semillas de Cactaceae.

Maheshwari (1950) y Rutishauser (1969) definen a los óvulos de Cactaceae como campilótropos, argumentando que la curvatura sólo aparece en la nucela y no en el saco embrionario, lo cual ocurre posterior a la fecundación. Bhojwani y Bhatnagar (1974) dicen que la mayoría de los óvulos de Cactaceae son anátropos y que la campilotropía (curvatura del saco embrionario y nucela) se presenta después de la fecundación, debido a la elongación de los tegumentos y nucela en el lado de la antirafe, la cual no aparece en la zona de la rafe, dejando muy corta la zona de la cálaza. Sin embargo, Flores y Engleman (1976) consideran que los óvulos y semillas de Cactaceae son generalmente de tipo anfítropo (con un crecimiento intenso y diferencial en los lados de la rafe y antirafe, con nucela, tegumentos y saco embrionario muy curvos tanto en anthesis como en la madurez). Estos mismos autores plantean que el término de funículo circinótropo es lo más adecuado para Opuntioideae, resaltando que al analizar los esquemas de Archibald (1939) corresponden a esa estructura y que malinterpreta como óvulo circinótropo. La curvatura llega a ser tan pronunciada en forma de U invertida, que le permite al embrión extenderse casi al doble de la longitud de la semilla, lo cual es ventajoso para que al momento de la germinación la plántula sea grande (Jhori, 1984). Los funículos pueden ser tan largos en Opuntioideae que dan un giro de una y media espiral alrededor del óvulo en *Opuntia aurantiaca* (Archibald, 1939), en el caso de *O. stenopetala* el funículo da una vuelta completa.

Dado que es complejo llegar a una buena definición y generalización, en el presente estudio consideramos como sinónimos los términos campilótropo (de Maheswari, 1950 y Rutishauser, 1969) y anfítropo (de Flores y Engleman, 1976), ya que no es fácil decidir qué tan pronunciada o no puede ser la curvatura del saco embrionario y nucela en flores en anthesis; asimismo usamos el término circinótropo para el funículo en *O. stenopetala*, tal como lo mencionan Flores y Engleman (1976) para otras *opuntias*.

El funículo circinótropo (circundante y envolvente) se encuentra en toda la subfamilia Opuntioideae (incluida la especie *O. stenopetala*). En varios miembros de la subfamilia Cactoideae, el funículo es circundante (da una vuelta completa o incompleta alrededor del óvulo), pero no es envolvente y, por lo tanto, no hay una cubierta funicular porque no hay fusión de los extremos laterales del funículo, como en especies columnares (*Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans*) estudiadas por Nuñez (2004).

Otro aspecto que causa confusión con respecto al funículo es que Archibald (1939), Maheshwari (1950) y Buxbaum (1955) mencionan que la cubierta funicular de Opuntioideae es “un arilo o tercer tegumento”, por ejemplo en *O. amyclaea* (Mejía y Cantwell, 2003), mientras que Flores y Engleman (1976) y Bregman and Bouman (1983) lo consideran sólo como “cubierta funicular”, ya que se presenta previo a la anthesis y surge del crecimiento lateral del funículo y se lignifica, no es un arilo de crecimiento funicular posterior a la fecundación, como los arilos de otras familias cuya función está relacionada con la dispersión de las semillas.

Flores y Engleman (1976) consideran que la dureza de la cubierta funicular en Opuntioideae sugiere una protección contra la abrasión por la dureza del suelo y la posibilidad de retener más agua, lo cual tiene lógica por la zona lignificada y por la presencia de tricomas jugosos y mucilaginosos en su parte externa como fue observado en *O. stenopetala* en el presente trabajo y en *O. tomentosa* (Flores, 2002; Orozco-Segovia *et al.*, 2007).

Los óvulos de las cactáceas algunas veces tienen funículos ramificados (Buxbaum, 1953; Maheshwari y Chopra, 1955). El funículo puede ser completamente libre como en Pereskioideae o Cactoideae, pero en Opuntioideae se distingue por dos zonas, como ocurre en la especie estudiada *O. stenopetala* y en *O. tomentosa* (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). Una es la parte proximal a la placenta, representada por el funículo libre y blando, mientras que la otra zona la representa la zona distal del funículo (que envuelve al óvulo), ya que se fusiona en la parte lateral y forma la cubierta funicular (Orozco-Segovia *et al.*, 2007).

La dureza de las cubiertas (seminal y funicular) de *Opuntia stenopetala* al igual que la de otras opuntias está relacionada con la presencia de lignina y taninos que sirven como protección al ataque de herbívoros u organismos patógenos (Swain, 1979). Los taninos (compuestos fenólicos del metabolismo secundario), se forman en las vacuolas y en las paredes celulares de la exotesta y en el endotegmen en menor cantidad (porque al parecer se consume ya que al final este estrato desaparece). Sin embargo, la verdadera funcionalidad no pudo ser demostrada, a pesar de ello se puede especular que la función más probable es la protección contra depredadores (herbívoros, insectos, bacterias y hongos) como lo reporta en general Swain (1979) para otras familias de angiospermas. También se menciona que los taninos protegen contra los daños de la luz ultravioleta y favorecen la dureza de la semilla (Swain, 1979). Indudablemente los taninos proporcionan el color a las semillas de *Opuntia stenopetala* estudiada y en *O. tomentosa* (Orozco-Segovia *et al.*, 2007), ya que de acuerdo al incremento de taninos va cambiando el tono desde semilla joven hasta semilla madura.

La cubierta seminal de *O. stenopetala* tiene estratos lignificados con fibras en la exotesta. Tanto la cubierta seminal como la funicular confieren dureza a la semilla, pero no impermeabilidad o latencia fisiológica como se ha mencionado para algunas semillas de *O. macrorhiza* (Timmons, 1942), *O. aurantiaca* (Archibald, 1939), *O. compressa* (Baskin y Baskin, 1977), *O. stricta* (Reinhardt *et al.*, 1999), *O. tomentosa* (Olvera-Carrillo *et al.*, 2003) y *O. rastrera* (Mandujano *et al.*, 1997, 2005).

Orozco-Segovia y colaboradoras en el 2007 demostraron en detalle la importancia de la parte blanda y libre del funículo, así como la cubierta funicular para *O. tomentosa*. Las autoras demostraron que la cubierta funicular y seminal no son impermeables ni latentes. Detallan sobre un canal de agua que se extiende debido a que las células parenquimáticas mueren durante su permanencia en el suelo y el canal se extiende permitiendo una rápida entrada de agua cuando ésta se encuentra disponible y las valvas (formadas lateralmente por la cubierta funicular y seminal) pueden fragmentarse y ser empujadas de la semilla durante sus periodos de hidratación, permitiendo que el embrión crezca y empuje las valvas. Ese estudio vino a aclarar la verdadera función de la cubierta funicular y seminal de las opuntias y a poner en evidencia la presencia del canal de agua, el cual también se presenta en *O. stenopetala*.

Con respecto a las papilas de la zona ventral del funículo en *O. stenopetala* y al igual que en otras especies de Cactaceae, también consideramos que funcionan como un obturador y tejido de transmisión por donde pasan los tubos polínicos desde la placenta hasta el micrópilo, lo cual fue definido inicialmente por Kapil y Prakash (1969) para *Cereus jamacaru* y *Ferocactus wislizeni* así como su degeneración posterior a la fecundación como en *O. tomentosa* (Flores, 2002; Orozco-Segovia *et al.*, 2007).

En Cactaceae, el endospermo es de tipo nuclear, en *Opuntia stenopetala*, se presenta este desarrollo, sin embargo, en la zona calazal, los núcleos se aglutinan de forma diferente a la zona micropilar. En la zona calazal hay mayor cantidad de citoplasma con respecto a los núcleos restantes e incluso tiene aspecto haustorial, lo cual también ha sido reportado en *Cereus jamacaru* (Kapil y Prakash, 1969) y *Astrophytum myriostigma* (Engleman, 1960). Posteriormente, como en *O. tomentosa* (Flores, 2002), *P. lychnidiflora* (Jiménez-Durán *et al.*, 2014), cactáceas columnares (Nuñez, 2004) y en especies descritas por Engleman (1960) y Flores y Engleman (1976), el endospermo se celulariza y se va consumiendo durante el desarrollo de la semilla, quedando escasamente alrededor de la radícula, hipocótilo y parte de los cotiledones (Maheswari, 1950;

Engleman, 1960). Davis (1966) describe que el endospermo en el género *Opuntia* no llega a celularizarse completamente, ya que es rápidamente consumido por el embrión en desarrollo.

A la par del endospermo en desarrollo, la nucela se convierte en perispermo y se va consumiendo durante el desarrollo del embrión, el cual se puede detectar aún en semilla madura, siendo escaso en especies de Cactoideae con respecto a las de Pereskioideae y Opuntioideae (Flores y Engleman, 1976; Flores, 2002), incluida la especie de este estudio, *O. stenopetala*. La presencia de perispermo varía en Cactaceae, hay una tendencia a la disminución del perispermo (así como del endospermo) cuando el hipocótilo es más suculento y los cotiledones son cortos (Flores y Engleman, 1976), como en *Astrophytum myriostigma*, *Thelocactus bicolor* (Engleman, 1960) y cactáceas columnares como *Pachycereus fulviceps*, *P. gaumeri*, *P. militaris*, *P. pringlei* y *Myrtillocactus geometrizans* (Nuñez, 2004).

La división transversal del cigoto, las fases de embrión columnar, globular, acorazonado, de torpedo y cotiledonario como ocurre en *O. stenopetala* ha sido reportada para muchas cactáceas, aunque en *Cereus jamacaru* la primera división es tangencial (Kapil y Prakash, 1969). La etapa de corazón no siempre es distinguible en Cactaceae, ya que el hipocótilo se extiende antes del surgimiento de los cotiledones.

En etapa madura, el embrión de *O. stenopetala* tiene forma de U, hacia el extremo micropilar se ubica la radícula, mientras que en el otro extremo se encuentran dos largos cotiledones, algunas especies de Cactoideae presentan cotiledones cortos y embriones ligeramente curvos como en *Astrophytum myriostigma* (Engleman, 1960).

La poliembrionía (presencia de más de un embrión en semillas) de origen nucelar es común en algunas especies de *Opuntia* (Archibald 1939; Maheshwari y Chopra 1955; Philbrick, 1963; Flores, 2002), *Mammillaria tenuis* y *Pereskia* (Tiagi 1967; Jiménez-Durán *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha determinado la ausencia de poliembrionía en *Astrophytum myriostigma*, *Thelocactus bicolor*, *Toumeyia*

papgracantha (Engleman, 1960), y *Ferocactus wislizeni* (Kapil y Prakash, 1969). Los embriones adicionales pueden provenir del suspensor, como ocurre en *C. Jamacaru* (Kapil y Prakash, 1969).

Con respecto a la formación de las semillas en *O. stenopetala* se corroboró que se da principalmente por vía sexual; y dado que es una especie dioica requiere del transporte de los granos de polen desde las plantas masculinas hasta las flores femeninas. Asimismo, con los experimentos de polinización controlada quedó demostrado que los polinizadores no son del todo eficientes, ya que el número de semillas obtenido de los tratamientos de polinización cruzada manual superaron al número obtenido en la polinización abierta (control).

Las semillas sólo se forman en las plantas femeninas, ya que las flores masculinas se secan y caen de la planta madre días después de la antesis, solo ofrecen el polen a los polinizadores, que normalmente son abejas y abejorros, sin embargo, hay muchos otros insectos visitantes, pero se desconoce si son polinizadores secundarios o son robadores de polen y/o néctar. El comportamiento abortivo de las flores masculinas (que no producen frutos) también ocurre en otra especie dioica, *Opuntia robusta* (Del Castillo y Trujillo, 2009).

El tratamiento de apomixis en campo dio resultados no esperados, ya que algunos frutos lograron formarse en las flores femeninas, esto puede deberse a varias razones. Una razón puede adjudicarse a que el polen al ser tan pequeño y con ayuda del viento, pudo haber atravesado las bolsas de tul y así caer en los estigmas, polinizándolas. Otra razón, puede ser que, al momento de embolsar, no se hayan cerrado bien las bolsas, permitiendo así la entrada de diferentes insectos, haciendo que la flor fuera polinizada con el polen acarreado de otros individuos. Sin embargo, el tratamiento de apomixis en el invernadero, dio los resultados esperados, ya que ninguna flor tratada formó semillas, corroborando el origen sexual de las semillas de *O. stenopetala*.



CONCLUSIONES

La formación de las semillas de *O. stenopetala* se da únicamente por vía sexual. La polinización cruzada es obligada y los polinizadores son poco eficientes.

Los óvulos son crasinucelados, bitégmicos y campilótrpos, lo cual implica que existe una curvatura en la nucela, en el saco embrionario y en el embrión. En *Opuntia stenopetala* el funículo se adhiere al micrópilo, dando una vuelta completa. El funículo se distingue por dos zonas, una es la parte proximal a la placenta representada por el funículo libre y blando, y la otra es la zona distal del funículo que envuelve a la semilla, por lo tanto, esta especie posee funículo circinótrofo (circundante y envolvente). En promedio se obtienen 168.87 óvulos por ovario.

Los frutos maduros de *O. stenopetala* son agridulces, alargados, rojo-púrpura y con espinas delgadas. La parte comestible y digerible (pulpa) la componen los tejidos blandos y parenquimáticos de los funículos libres, la parte externa de la cubierta funicular y la parte interna de la placenta.

Se presentan una división transversal del cigoto, mostrando las fases de embrión columnar, globular, acorazonado, de torpedo y cotiledonario. El embrión maduro tiene forma de U, en un extremo micropilar se encuentra la radícula y la cofia, mientras que en el otro extremo se encuentra el meristemo apical y dos grandes cotiledones

El endospermo es tipo nuclear, formando un sincicio calazal, después pasa por una fase celular, consumiéndose durante el desarrollo del embrión, excepto cerca de la radícula. La nucela se convierte en perispermo y en semilla madura solo se observa cerca de la calaza.

La cubierta seminal contiene estratos lignificados con fibras en la exotesta, así como los estratos internos de la cubierta funicular, mientras su parte externa tiene tricomas jugosos y mucilaginosos.

La dureza de la cubierta de las semillas se debe a la presencia de la envoltura funicular y seminal, las cuales poseen lignina y taninos, que posiblemente le dan protección contra depredadores y de los rayos ultravioleta durante la dispersión. La semilla de *O. stenopetala* es exotestal, y los taninos le proporcionan el color.



LITERATURA CONSULTADA

- Alfaro A. I. 2008. Estudio de muerte celular programada durante el desarrollo de las anteras en flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* Engelman y *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. pp. 36.
- Anderson E. F. 2001. *The cactus family*. Timber Press, Portland, EUA, pp. 776.
- Archibald, E. 1939. The development of the ovule and seed of jointed cactus (*Opuntia aurantiaca* Lindley). *South African Journal of Science* 36:195-211.
- Arias M. S. 1997. Distribución general. En: Valle, C. (ed.). *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México.
- Arreola H. J. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: Valle, C. (ed.). *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México, pp. 27-35.
- Baskin J. M. y Baskin C. C. 1977. Seed and seedling ecology of *Opuntia compressa* in Tennessee cedar glades. *Journal of the Tennessee Academy of Science*.
- Bhojwani S. y Bhatnagar S. P. 1974. *The Embriology of Angiosperms*. 4a Edición. Vikas Publishing House Pvt. Ltd. Nueva Delhi.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las Cactáceas de México. 2ª Edición. Volumen 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 56-61 168, 338, 339.
- Bregman R. y Bouman F. 1983. Seed germination in Cactaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 86:357-374.
- Buxbaum F. 1953. *Morphology of Cacti*. Section II. The flower. Pasadena, Abbey Garden Press. California.
- Buxbaum F. 1955. *Morphology of Cacti*. Section III. Fruits and Seeds. Pasadena, Abbey Garden Press, California.
- Camacho A. 2013. Efecto de las auxinas en la esterilidad femenina de *Opuntia stenopetala* Engelm. (Cactaceae). Tesis de Maestría (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Carrasco G. A. 2016. Muerte celular programada en el desarrollo del androceo de *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM, México. (En prensa).
- Chopra R. N. 1957. The mode of embryo sac development in *Opuntia aurantiaca* L. indl. A reinvestigation. *Phytomorphology* 7:403-406.
- Corner E. J. H. 1976 *The seeds of dicotyledons*, 1 st edn, 2 vols. Cambridge University Press, Cambridge London New York Melbourne.
- Davis G. L. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. Wiley, New York London Sydney.

- Del Castillo R. F. 1986. Semillas, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 31: 5-10.
- Del Castillo R. y González M. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71: 185-196.
- Del Castillo R. y Trujillo A. 2009. Reproductive implications of combined and separate sexes in a trioecious population of *Opuntia robusta* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 96: 1148-1158 DOI information:10.3732/ajb.0800301
- Engleman E. M. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. *Amer. Jour. Bot.* 4 (6)7: 460-167.
- Flores M. E. y Engleman E. M. 1976. Apuntes sobre anatomía y morfología de las semillas de cactáceas. I. Desarrollo y estructura. *Rev. Biol. Trop.*, 24 (2): 199-227, 1976.
- Flores R. LI. 2002. Embriología de *Opuntia tomentosa* Salm-Dick var. *tomentosa* Salm-Dick (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 79 p.
- Flores R. LI. 2005. Esterilidad masculina en *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias (Biología experimental). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 87pp.
- Flores-Rentería LI., Orozco-Arroyo G., Cruz-García F., García-Campusano F., Alfaro I. y Vázquez Santana S. 2013. Programmed cell death promotes male-sterility in the functional dioecious *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). *Annals of Botany* 112: 789-800.
- Gómez S. S. 2010. Embriología de la especie androdioica *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backerberg (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F.
- Guzmán U. 1997. Grupos taxonómicos. En; Valle, C. (ed.). *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México, D.F. pp. 37-41.
- Guzmán U., Arias S., Dávila P. 2007. *Catálogo de Cactáceas Mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México, CONABIO. México.
- Hernández R. 2008. Estudio de la muerte celular programada en el gineceo de las flores masculinas de *Opuntia robusta* J. C. Wendl. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencia, UNAM. México, D. F. 72pp.
- Hernández R. 2011. Estudio comparativo de la sexualidad floral de *Echinocereus coccineus* y *Echinocereus polyacanthus* (Cactoideae: Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias (Biología experimental), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 78pp.

- Hunt D.R. (Comp.). 1999. CITES *Cactaceae Checklist*. Ed. II. Remous Limited, Milborns Port, Royal Botanic Gardens Kew and International Organization for Succulent Plant Study. London. P. 224.
- Janczur M.K., León Solano H.J., Solache Ramos L.T., Mendoza Reyes C.H. y Oro Cerro MdC. (2014) Chemical and Physical Defense Traits in Two Sexual Forms of *Opuntia robusta* in Central Eastern México. *PLoS ONE* 9(3): e89535. doi:10.1371/journal.pone.0089535.
- Jiménez-Durán K. Arias-Montes S. Cortés-Palomec A. y Márquez-Guzmán J. 2014. Embryology and Seed Development in *Pereskia lychnidiflora* (Cactaceae). *Haseltonia* 2014 19, 3-12.
- Johri M. 1984. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. Berlin.
- Kapil R. N. y Prakash N. 1969. Embriology of *Cereus jamacaru* and *Ferocactus wislizeni* an comments on the systematic position of the Cactaceae. *Botaniska Notiser* 122: 409-426.
- López, L., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Laboratorio de Desarrollo en Plantas. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 178pp.
- Loza-Cornejo S. 2004. Características del desarrollo de plántulas de seis especies de Pachycereceae (Cactoideae-Cactaceae). Tesis. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, D.F. pp. 157.
- Maheshwari P. 1950. An introduction to the Embryology of Angiosperms. New York and London.
- Maheshwari P. y Chopra R. N. 1954. Polyembryony in *Opuntia dillenii*. *Curr. Sei.* 23:130-131.
- Maheshwari P. y Chopra R. N. 1955. The structure and development of the ovule and seed of *Opuntia dillenii* Haw. *Phytomorphology* 5: 112-122.
- Majure L.C., Judd W.S., Soltis P.S. y Soltis D.E. 2012. Phylogeny of *Opuntia* s.s. (Cactaceae): Clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal of Botany* 99 (5):847-864.
- Mandujano M.C., Golubov J., Montaña C. 1997. Domancy and endozoochorous dispersal of *Opuntia rastrera* seeds in the northern Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments* 36: 259–266.
- Mandujano M.C., Montaña C., Rojas-Aréchiga M. 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments* 62: 15–21.
- Márquez G. J., Collazo O. M., Martínez G. M., Orozco S. A. y Vázquez S. S. 2013. Biología de Angiospermas. 1° Edición. UNAM, México, D.F. pp. 137-149.
- Mauritzon J. 1934. Ein Beitrag zur Embryologie der Phytolaccaceen und Cactaceen. *Bot. Notiser.*, 1934 III: 135.

- Mauseth J. D. 1995. *Botany. An Introduction to Plant Biology*. 2a Edición. Saunders College Publishing. USA.
- Mejía A. y Cantwell, M. 2003. Prickly Pear Fruit Development and Quality in Relation to Gibberellic Acid Applications to Intact and Emasculated Flower Buds. J. PACD.
- Neumann M. 1935. Die Entwicklung des pollens, der samenanlage und des embryosackes von *Pereskia amapola* var. *Argentina*. Ost. Bot. Z. 84: 1-30.
- Núñez M. C. 2004. Cactáceas columnares de México: estudio embriológico de cinco especies de la tribu *Pachycereae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 178pp.
- Olvera-Carrillo Y., Márquez-Guzmán J., Barradas V. L., Sánchez-Coronado M. E., y Orozco-Segovia A. 2003. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* SD, a cacti from the México valley. *Journal of Arid Environments*, 55(1), 29-42.
- Orozco G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelman (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. pp. 82.
- Orozco G. 2005. Clonación de TSL y STY en *Opuntia stenopetala*. Dos genes asociados al desarrollo del estilo y el estigma. Tesis de maestría (Biología experimental). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. pp. 87.
- Orozco-Arroyo G., Vázquez-Santana S., Camacho A., Dubrovsky J.G. y Cruz-García F. 2012. Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta* 236: 225–238.
- Orozco-Segovia A., Márquez-Guzmán J., Sánchez-Coronado M.E., Gamboa de Buen A., Baskin J.M., Baskin C.C. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Ann. Bot.* 99, 581-592.
- Ortega G. P. F. 2016. Florivoria de *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backerberg (Cactaceae) en la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F.
- Parada D. 2004. Estudio comparativo de las estructuras reproductoras de *Mammillaria sanangelensis* Sánchez Mejorada y *Mammillaria haageana* Pfeiffer (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 84 pp.
- Philbrick N. 1963. Zygotic and Agamospermous reproduction in *Opuntia littoralis*. *Ame. Jour. Bot.* Abstr. 50:637.
- Pimienta B. E. 1990. El nopal tunero. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. p. 235.

- Reinhardt C. F., Rossouw L., Thatcher L., y Lotter W. D. 1999. Seed germination of *Opuntia stricta*: implications for management strategies in the Kruger National Park. *South African journal of botany*, 65(4), 295-298.
- Reyes-Agüero J. A., Aguirre R. J. R. y Valiente-Banuet A. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments* 64(4): 549–585.
- Rojas-Aréchiga M. y Vázquez-Yañez C. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environment* 44: 85-104.
- Rosas R. I. 2013. Revisión y biogeografía del género *Opuntia* (Cactaceae) en Aguascalientes. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. pp. 24-93.
- Rutishauser A. 1969. Embryologie und Fortpflanzungsbiologie der Angiosperm. Springer-Verlag. Wien, Austria.
- Sánchez D. 2007. Embriología de *Mammillaria dioica* K. Brandegees (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 52pp.
- Scheinvar L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro: Diversidad y riqueza. 1° Edición, Fondo de Cultura Económica, México, D.F. pp. 81-83, 89-92.
- Scheinvar L., Olalde G., Filardo S. y Beckler P. 2010. Diez especies mexicanas productoras de xoconostles: *Opuntia* spp. y *Cylindropuntia imbricata* (Cactaceae). Universidad Nacional Autónoma de México/Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.
- Silva J. A. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. 61 pp.
- Swain T. S. 1979. Tannins and lignins. In: Rpsenthal GA, Janzen DH (eds) *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, pp 657-675.
- Tiagi Y. D. 1954. Studies in the floral morphology of *Opuntia dillenü* Haw. 1. Development of the ovule and gametophytes. *Bot. Notiser.*, 4: 343-356.
- Tiagi Y. D. 1956. Polyembryony in *Mammillaria tenuis* D. C. *Bull. Bot. Soco Univ. Saugar*, 8: 25-27.
- Tiagi Y. D. 1957. Studies in floral morphology. III. A contribution to the floral morphology of *Mammillaria tenuis* D. C. *J. Univ. Saugar*, 6B: 7-31.
- Tiagi Y. D. 1967. Contribution to the embryology of the genus *Pereskia*. *Proc. 54th Indian Sci. Congr.* 324-325.
- Timmons F.L. 1942. The dissemination of prickly pear seed by jack rabbits. *Journal of the American Society of Agronomy.*;34:513–520.

- Vázquez-Yáñez C., Orozco-Segovia A., Rojas-Aréchiga M. y Cervantes V. 1997. La reproducción de las Plantas: Semillas y Meristemas. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 167.
- Vázquez-Yáñez C. y Orozco-Segovia A. 1999. Ecología fisiológica de las semillas y su relación con la conservación. En: Orellana, R., Escamilla. J. A & Larqué-Saavedra. A (eds). Ecofisiología Vegetal y Conservación de Recursos Genéticos, México. pp. 51-57.
- Wallace R.S. y Dickie S.L. 2002 Systematic implications of chloroplast DNA sequence variation in the Opuntioideae. In: Hunt D, Taylor N ed(s). Studies in the Opuntioideae (Cactaceae). Milborne Port, Dorset: David Hunt ((Succulent plant research; v.6)). pp.9-24 -. ISBN 095381341X. En Molecular systematics. Geog=0 Systematics: ANGIOSPERMAE (CACTACEAE) (KR, 200201590).

