



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Flujo de polen de *Opuntia tomentosa* Salm-Dick en  
Cadereyta de Montes, Querétaro, México**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**LINDA MARIANA MARTÍNEZ RAMOS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN MADUJANO SÁNCHEZ**

**2016**

**CD.MX.**





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  
Martínez  
Ramos  
Linda Mariana  
55 31 25 17 21  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Faculta de Ciencias  
Biología  
106003112
2. Datos del tutor  
Dra  
María del Carmen  
Mandujano  
Sánchez
3. Datos del sinodal 1  
Dra  
Sonia  
Santana  
Vázquez
4. Datos del sinodal 2  
Dr  
Ángel  
Salvador  
Arias  
Montes
5. Datos del sinodal 3  
Dra  
Concepción  
Martínez  
Peralta
6. Datos del sinodal 4  
M en C  
Juan Carlos  
Flores  
Vázquez
7. Datos del trabajo escrito  
Flujo de polen de *Opuntia tomentosa* Salm-Dick, Cadereyta de Montes, Querétaro, México.  
Tesis Profesional.  
75p  
2016

## AGRADECIMIENTOS OFICIALES

A la Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez por la dirección de esta tesis.

Al Laboratorio de Genética y Ecología del Departamento de Ecología de la Biodiversidad del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que prestó sus instalaciones para realizar este trabajo.

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del proyecto PAPIIT-UNAM IN207411-3, SEP-Conacyt 221362 y del presupuesto operativo del Instituto de Ecología, UNAM, otorgados a la Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez.

Al Taller de “Ecología Terrestre y Manejo de Recursos Bióticos”, de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la asesoría de los profesores que allí participan: el Dr. Zenón Cano Santana, el Dr. Víctor López Gómez, la M. en C. Irene Pisanty Baruch, el M. en C. Iván Castellanos Vargas, la M. en C. Rosa Mancilla Ramírez y la Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños, donde se realizó esta tesis.

Agradezco la disposición y tiempo que brindaron, M. en C. Iván Castellanos, M. en C. Aldanelly Galicia Pérez, Biól. Hugo Altamirano, Berenice Morales Medina y Mariana Cano Rodríguez, quienes me ayudaron en el trabajo de campo, en elaborar el análisis estadístico.

Al personal del Jardín Botánico Regional de Cadereyta y en especial al Ing. Emiliano Sánchez, director, por el apoyo y las facilidades otorgadas.

A la Dra. Mariana Rojas Aréchiga, y a la Lic. Anabel Domínguez Reyes, por el apoyo en la logística de las salidas de campo y trabajo de laboratorio.

Al Laboratorio de Desarrollo de Plantas a cargo de la Dra. Judith Márquez, en especial al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong, por el apoyo en la elaboración de reactivos.

A mis sinodales, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Concepción Martínez Peralta, Dr. Ángel Salvador Arias Montes y M. en C. Juan Carlos Flores Vázquez por su revisión y contribución a este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, por ser mi segunda casa.

A Meli, por sus consejos, empujones y coscorriones, que me permitieron crecer en lo personal y en lo académico.

A mis padres, Martha S. Ramos y Gerardo Martínez, por ser mis maestros de vida, por apoyarme, comprenderme y sobre todo por brindarme dulces palabras cuando más las necesito.

A mis hermanos, Gerardo, Paula y Manuel, por enseñarme a pasar los obstáculos que se me presenten y a tener la mejor disposición siempre.

A mis amigas, Esther y Ana que, con sus charlas acompañadas por una taza de té, hicieron que la carrera fuera una gran etapa de mi vida.

A Bere, porque no sólo me ayudó en campo, también me brindó su amistad.

A mis colegas, Pactli y Abril, por los momentos que pasamos juntos y por el apoyo que me dieron a lo largo de la carrera.

A mis compañeros y amigos, por compartir conmigo risas y llantos durante toda la carrera.

A mis compañeros de campo y amigos: Alda, Dona, Graciela, Dámaris, Isabel, Mariana, Rebeca, Lucy, Yola, Sandino, Esteban, Tania e Ilse. Por hacerme pasar un buen rato en medio del semidesierto.

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1 REPRODUCCIÓN EN PLANTAS .....	2
1.2 ESTRUCTURA DE LA FLOR.....	6
1.3 BIOLOGÍA FLORAL DE LA FAMILIA CACTACEAE .....	7
1.4 FENOLOGÍA.....	9
1.5 POLINIZACIÓN.....	10
1.6 FLUJO DE POLEN.....	11
1.7 CALIDAD DEL POLEN .....	16
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>19</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 SITIO DE ESTUDIO.....	20
4.2 SISTEMA DE ESTUDIO .....	21
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
4.3.1 <i>Pruebas de viabilidad.....</i>	26
4.3.1.1 Polinización controlada: <i>Fruit set</i> y <i>seed set</i> .....	26
4.3.1.2 Azul de anilina en lactofenol.....	27
4.3.1.3 Tinción de Alexander.....	28
4.3.2 <i>Flujo de polen .....</i>	29
4.3.2.1 Fenología.....	29
4.3.2.2 Distribución angular de las flores.....	30
4.3.2.3 Distancia del flujo .....	31
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 PRUEBAS DE VIABILIDAD .....	32
5.1.1 Polinización controlada: <i>Fruit set</i> y <i>seed set</i> .....	32
5.1.2 Azul de anilina en lactofenol .....	33
5.1.3 Tinción de Alexander.....	35
5.2 FLUJO DE POLEN.....	37
5.2.1 <i>Tablas de contingencia.....</i>	37
5.2.2 <i>Distribución angular de las flores.....</i>	39

5.2.3 Distancia del flujo.....	42
5.2.4 Correlaciones .....	43
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
6.1 PRUEBAS DE VIABILIDAD .....	44
6.2 FLUJO DE POLEN.....	46
6.2.1 Tablas de contingencia y Fenología floral.....	46
6.2.2 Distribución angular de las flores.....	48
6.2.3 Distancia del flujo.....	49
6.2.4 Correlaciones .....	51
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 1. ....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>63</b>

*“Lo mejor de la vida es el pasado, el presente y el futuro”.*

P. Pasolini



Martínez, R. L. M. 2016. Flujo de polen de *Opuntia tomentosa* Salm-Dick, Cadereyta de Montes, Querétaro, México. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 74p.

## Resumen

La mayoría de las angiospermas han desarrollado adaptaciones para que los polinizadores muevan los gametos masculinos (polen) hacia los órganos sexuales femeninos (gineceo). Los polinizadores reciben polen, néctar y fragancias como recompensas, y en el proceso de consumo determinan las distancias alcanzadas por el polen. La transferencia de polen es efectiva si los polinizadores muevan el polen entre flores de individuos genéticos diferentes y de la misma especie (intraespecífica). La evaluación del flujo polínico evidencia el flujo génico y estructura poblacional, la eficiencia de los distintos polinizadores, la evolución de los sistemas reproductivos y de las características florales. La evaluación del flujo se hace a partir de marcadores morfológicos o genéticos; de los marcadores morfológicos los más utilizados son los análogos de polen (povos fluorescentes), y se ha reportado que pueden moverse a una mayor o menor distancia comparada con el flujo real. En este trabajo se estudió el flujo del polen de *Opuntia tomentosa* con dos marcadores morfológicos: colorantes vegetales y povos fluorescentes. El estudio se realizó en un matorral xerófilo, donde coexisten varias especies de Opuntioideae (*Cylindropuntia imbricata*, *O. cantabrigiensis*, *O. streptacantha* y *O. robusta*), en Cadereyta de Montes, Querétaro, México. Además, se evaluó si los marcadores tienen un efecto sobre el desempeño del polen con tres pruebas de viabilidad (Azul de anilina en lactofenol, tinción de Alexander y número de frutos, *fruit set* y semillas, *seed set*). No hubo diferencias significativas en el *fruit set* entre los marcadores y el control, en contraste el *seed set* del control fue > polvo fluorescente y > al colorante (media=  $72.56 \pm 14.32$  media =  $60.96 \pm 20.14$  semillas media=  $45.07 \pm 27.48$  semillas, respectivamente). Las pruebas de viabilidad con tinciones muestran que ambos métodos reducen la viabilidad del polen (16% y 38%, respectivamente). El flujo de polen de *Opuntia tomentosa* se midió en 30 vecindarios reproductivos que fueron establecidos durante el 2015. Dentro de cada vecindario se marcó una planta focal y a partir de ella se midió la distancia a otros individuos de Opuntioideae, su ángulo y la cantidad de flores. A las flores de cada focal se les tiñó el polen con los dos marcadores morfológicos para seguir el flujo. La distancia entre marcadores fue la misma ( $F_{(1,145)}=2.69$   $P=0.102$ ). Se encontró que la deposición de polen es función de la cantidad de flores y no depende del ángulo ni de la distancia de las flores de los vecinos reproductivos. *Opuntia tomentosa* tiene una floración de abril a mayo y, cuando hay diferenciación temporal con las floraciones de las demás especies de Opuntioideae se favorece la deposición de polen intraespecífica; sin embargo, cuando hubo flores de las demás especies existió deposición interespecífica de polen marcado, lo que podría llevar a la disminución del éxito reproductivo de *O. tomentosa* y abre la posibilidad de que exista hibridación.

# 1. Introducción

## 1.1 Reproducción en plantas

Las plantas con flores o angiospermas, por ser organismos sésiles, se ven condicionadas para adquirir recursos, enfrentar los desafíos que les impone el ambiente y reproducirse de manera eficiente (Richards, 1986; Harder y Barret, 1996; Domínguez y Pérez, 2013). Por su condición inmóvil, pareciera que las plantas no controlan su reproducción, sin embargo, esto está lejos de la realidad, pues han desarrollado desde hace 135 Ma (Martínez-Gordillo; 2013) sistemas de reproducción complejos que varían ampliamente (Richards, 1986; Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2013) y que están directamente relacionados con la flor, la unidad funcional básica de la reproducción sexual de las angiospermas (Barret, 2003).

La expresión sexual en las plantas cambia a nivel de las flores, individuos y de población (Wyatt, 1983; Cox, 1988; Barret, 2002; Mandujano *et al.*, 2010). A nivel de flor, encontramos tres grupos, a las hermafroditas, a las pistiladas y a las estaminadas. El primer grupo está conformado por flores que tienen órganos sexuales femeninos (gineceo) y órganos sexuales masculinos (androceo); el segundo es de flores únicamente con gineceo; y las estaminadas son flores sólo con androceo (Barret, 2002, Cheptou, 2012). A nivel de individuo y a nivel de grupos de plantas encontramos un mayor número de combinaciones como el dioicismo y el monoicismo (Figura 1).

En este trabajo nos enfocaremos en la expresión sexual a nivel de grupos de plantas o, dicho de otro modo, a nivel de población. La expresión sexual más común es el hermafrodita, puesto que se presenta entre el 70 al 90% de las angiospermas (Richards, 1986; Barret y Hough, 2013; Dufay *et al.*, 2014) y consiste en individuos con flores hermafroditas (Ludlow, 2013; ejemplos de especies hermafroditas: *Capsicum* sp., *Oenothera* sp., Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2013; *Mammillaria Huitzilopochtli*, Flores-Martínez, 2013). Otros sistemas que se presentan en las angiospermas son el monoico (5%) y el dioico (~4-7%; Richards, 1986; Renner y Ricklefs, 1995); el sistema monoico implica que los individuos presenten flores estaminadas y flores pistiladas (Ludlow, 2013), como sucede en *Curcubita pepo*, *Zea mays* (Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2013) y *Alnus glutinosa* (Richards, 1986); el dioico se conforma de individuos con flores estaminadas e individuos con flores pistiladas, siendo *Melandrium dioicum* un ejemplo (Baker, 1947). En el sistema dioico se pueden presentar individuos bisexuales mezclados con individuos unisexuales,

sistemas conocidos como ginodioicos (i.e., plantas femeninas y hermafroditas) y como androdioicos (i.e., plantas masculinas y hermafroditas; Wyatt, 1983; Richards, 1986; Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2013) (Figura 1).

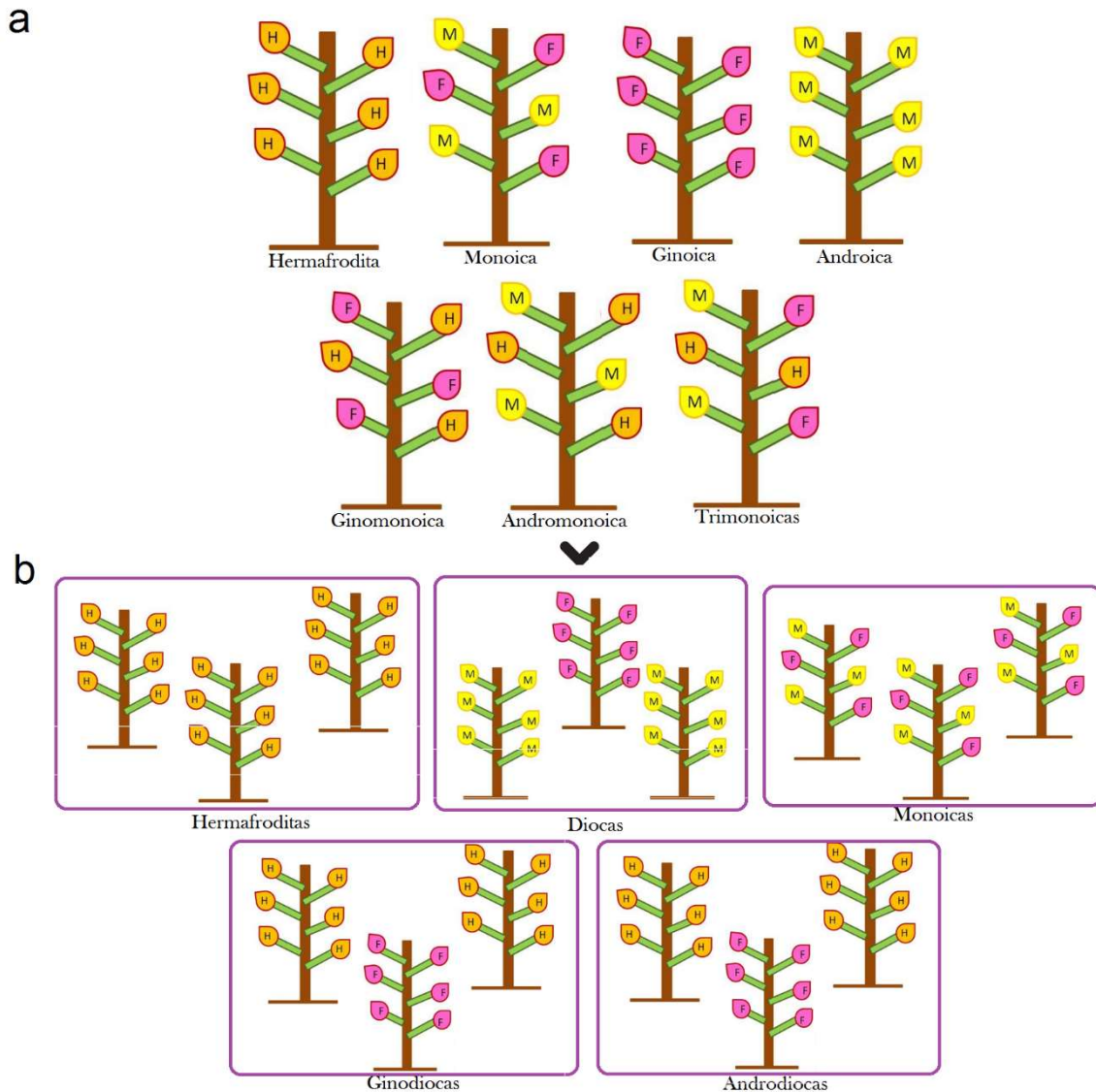


Fig. 1. Expresión sexual en la plantas con flores. a) Expresión sexual a nivel de individuo y b) Expresión sexual a nivel de grupo de plantas. Donde h indica flores hermafroditas, m flores masculinas (estaminadas) y f flores femeninas (pistiladas). Imagen tomada y modificada de [www.investiciencias.com](http://www.investiciencias.com)

En el sistema hermafrodita, el movimiento de polen puede ocurrir de manera intra e interfloral, si no existe alguna barrera que lo impida, lo cual abordaremos más adelante. Este movimiento de polen está asociado con la fecundación en plantas, la cual es un proceso conformado por dos partes, la primera es la unión del núcleo de una célula espermática (que está dentro del polen) a la ovocélula y la segunda es la

unión del núcleo de la otra célula espermática a los núcelos polares de la célula central del gametofito femenino para formar al embión y el endospermo de las semillas (Raven y Evert, 1981; McCauley *et al.*, 2013). Las flores tienen la oportunidad de autofecundarse si el polen de una flor cae sobre el estigma de la misma flor (autogamia) o de otra flor del mismo individuo (geitonogamia; Johnson y Edwards, 1999), o presentar polinización cruzada (xenogamia o alogamia), es decir, el polen de una flor se deposita sobre el estigma de la flor de un individuo genéticamente distinto (Richards, 1986; Barret, 2002; Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2013).

La autofecundación lleva a la formación de semillas que garantizan el mantenimiento del genotipo parental probado y adaptado en un determinado ambiente a un bajo costo y en un menor tiempo; sin embargo, este proceso puede llevar a un aumento en la homocigosis y en consecuencia a la expresión de alelos deletéreos recesivos o parcialmente recesivos, que por lo general están ocultos en genotipos heterocigos, y en consecuencia se puede originar una depresión por endogamia (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2013). Por ello, las especies hermafroditas han desarrollado varias estrategias que promueven la reproducción cruzada y así se promueva cierta variabilidad genética (Lovett y Lovett, 1988). En general, estas estrategias se dividen en dos, por procesos morfológicos y por procesos fisiológicos; en el ámbito morfológico se encuentra la hercogamia, que es la separación espacial de los órganos sexuales masculino y femenino. En el ámbito fisiológico se tiene a la dicogamia, que es la separación temporal de la maduración de los órganos sexuales masculino y femenino; y a los sistemas de incompatibilidad que son una barrera fisiológica que evita la fecundación entre flores genéticamente cercanas (Wyatt, 1983; Weberling, 1992).

Los sistemas sexuales a nivel de plantas hermafroditas pueden ser autocompatibles o autoincompatibles. Un sistema es compatible cuando, después de la polinización con polen propio, el individuo es capaz de producir semillas viables. En cambio, en el sistema autoincompatible, la única manera de formar semillas es a través de la polinización cruzada (xenogamia, alogamia; Richards, 1986, Li y Newbigin, 2002). Al permitir que los pistilos distinguan entre el polen propio del polen de otra planta con genotipo distinto, y de solo permitir que el polen de otras plantas fertilice a los óvulos, los sistemas de incompatibilidad previenen la fecundación después de la autopolinización y la polinización por geitonogamia (Li y Newbigin, 2002). Sin embargo, la existencia de autoincompatibilidad en una especie podría no ser una

barrera para la ocurrencia de movimiento de polen entre especies cercanas (Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2013), dando origen a, por ejemplo, la hibridación (Stebbins, 1950; Brown y Mitchell, 2001; Donoso *et al.*, 2004). La ausencia o la poca eficiencia de esta última estrategia, junto con otras estrategias de aislamiento reproductivo, aumenta la frecuencia de hibridación entre especies genéticamente cercanas (Donoso *et al.*, 2004), lo que puede traer consecuencias en la historia evolutiva de las especies involucradas. Esta hibridación ocurre siempre que las especies en cuestión coexistan o estén en contacto espacial (Donoso *et al.*, 2004). Las consecuencias para la evolución de las especies implicadas dependerá de las condiciones en las que se produce la hibridación (Stebbins, 1950), por ejemplo, Brown y Mitchell (2001) estudiaron el efecto de la hibridación entre *Lythrum salicaria*, una especie invasora, y *L. alatum*, una planta que habita en ambientes áridos, y concluyeron que a pesar de que se produzcan muy pocas semillas de la deposición de polen de *L. salicaria* en *L. alatum*, no descartan la posibilidad de que se forme un híbrido el cual pudiese resistir mejor en hábitats áridos y pueda desplazar a la especie nativa y a otras especies de porte herbáceo. En un experimento de polinizaciones manuales entre varias especies del género *Opuntia* (*Opuntia robusta*, *O. cochinera*, *O. streptacantha*, *O. leucotricha* y *O. rastrera*), si hubo formación de semilla en las polinizaciones interespecíficas y además se encontró la incidencia de progenie viable hasta la fase de plántula (Trujillo y Espinosa, 1991). Las hibridaciones entre dos especies son más difíciles de producirse en la medida en que las barreras entre las dos especies son más fuertes (Stebbins, 1950; Faegri y van der Pijl, 1979; Donoso, 2004). Si estas barreras son puramente de aislamiento ecológico, estacional o mecánico, la generación posterior ( $F_1$ ) producida por hibridación puede ser totalmente fértil del mismo modo que el producto del cruzamiento de dos individuos dentro la misma especie. Sin embargo, lo más común es que exista un cierto grado de esterilidad y debilidad híbrida que disminuye la capacidad reproductiva de la generación  $F_1$  (Stebbins, 1950; Donoso, 2004).

## 1.2 Estructura de la flor

Las flores completas poseen cuatro verticilos: cáliz, corola, androceo y gineceo (Ludlow, 2013). Enfocándonos en la familia Cactaceae, existen modificaciones que caracterizan a la flor, por ejemplo, cada una de las flores de *Opuntia* está parcialmente rodeada por tejido de tallo, región conocida como pericarpelo. El pericarpelo se encuentra rodeando a los estambres (androceo) y en medio de ellos se encuentra el pistilo (gineceo, como se representa en la Fig. 2; Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001; Mandujano *et al.*, 2010).

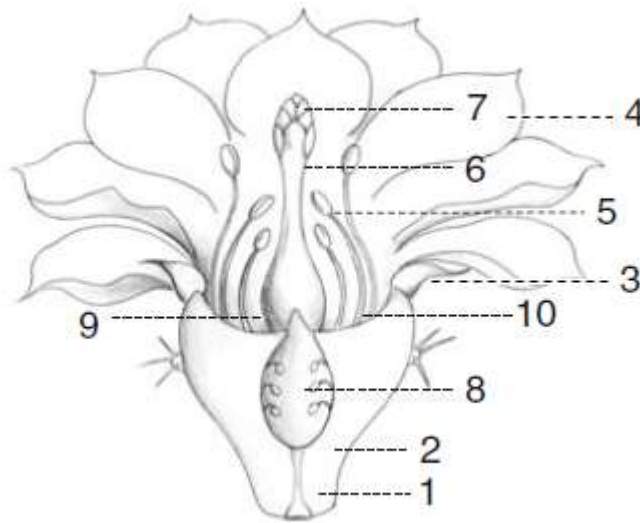


Fig. 2. Flor de *Opuntia*. Donde 1 pedúnculo, 2 pericarpelo, 3 segmentos externos del perianto, 4 segmentos internos del perianto, 5 estambres, 6 pistilo (que incluye: estilo, 7 lóbulos del estigma y 8 cámara ovárica), 9 cámara del néctar y 10 zona del receptáculo. Tomado de Mandujano *et al.*, 2010

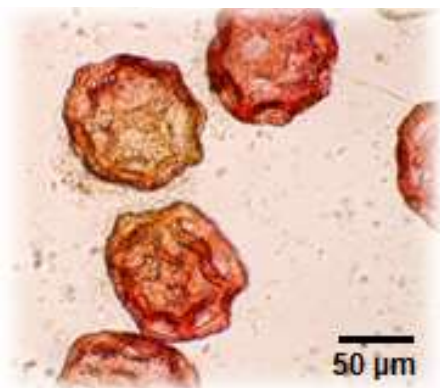


Fig. 3. Polen de *Opuntia* (dodecaédrico) y se dispersa en mónadas. Foto: Dale Deham-Logsdon

El androceo está constituido por esporófilas modificadas portadoras de sacos polínicos (estambres), dentro de los cuales se encuentran los granos de polen (Ludlow, 2013). Los estambres están formados por un filamento que sostiene en el extremo superior a la antera, órgano portador del polen. Una antera típica en las angiospermas está formada por cuatro esporangios, tejido conectivo y un haz vascular (Ludlow, 2013). El polen entre las especies varía en su morfología, la cual consiste en la descripción de sus aberturas, pared, estructura y ornamentación de la exina, polaridad, dimensiones, forma y asociación, entre otras características (Ludlow, 2013). Por ejemplo, el polen de la subfamilia Opuntioideae (Cactaceae) tiene una forma dodecaédrica y poliperturada (Fig. 3, Bravo-Hollis, 1978). El polen es dispersado ya sea por grupos o aisladamente. Cuando se dispersa aisladamente se les llama mónadas y si se dispersan en unidades compuestas llegan a llamarse díadas, tétradas, políadas, y en casos específicos pueden existir másulas (Fanaceae) o polínios (Orchidaceae; Ludlow, 2013).

### 1.3 Biología floral de la familia Cactaceae

La biología de la reproducción de las cactáceas es un campo relativamente inexplorado, y, debido a la variedad de formas, rutas fotosintéticas, y diversidad, las investigaciones se han centrado en su taxonomía, morfología y fisiología (Gibson y Nobel, 1986; Mandujano *et al.*, 2010). Las flores de los cactus son sésiles y solitarias, y comúnmente sólo una flor es producida por aréola; por lo regular tienen forma de campana y presentan simetría radial (son actinomorfas), pero en especies epífitas las flores son ligeramente bilaterales (zigomorfas), mientras que los estambres y los estilos se localizan en la parte ventral de la flor (Pimienta y Castillo, 2002; Mandujano *et al.*, 2010). Las cactáceas se caracterizan por la presencia de flores grandes y atractivas (Ross, 1981).

Las flores usualmente abren y cierran durante el mismo día, sin embargo, existen especies que pueden abrir varios días, como es el caso de *Mamillaria Huitzilopochtli*, pues tiene flores con una longevidad de hasta seis días (Flores-Matínez *et al.*, 2013). En el género *Opuntia*, la apertura floral típicamente dura entre 8 y 11 horas (Rosas y Pimienta, 1986; del Castillo y González-Espinosa 1988; Mandujano *et al.*, 1996) sin embargo las flores de algunas especies pueden abrir un segundo día (Rosas y Pimienta, 1986) y para *Cylindropuntia* se describe una apertura diurna (Grant y Hurd, 1979).

Esta familia presenta un ovario ínfero y sólo algunos pocos tienen un ovario súpero (principalmente del género *Pereskia*; Bravo-Hollis 1978; Gibson y Nobel, 1986). Los estambres son numerosos, presentan un arreglo en espiral y algunos géneros presentan sensibilidad tigmotáctica, es decir, se mueven cuando son tocados (Rosa y Pimienta, 1986), facilitando así la colección de polen de los insectos durante las visitas florales (Grant y Hurd, 1979). Las flores de los cactus son polinizadas únicamente por animales (Pimienta y Castillo, 2002) y suelen tener síndromes de polinización muy diversos, algunas generalistas (Waser *et al.*, 1996 en Reyes-Agüero *et al.*, 2006; y por ejemplo *Echinopsis chiloensis* spp.; Lemaitre *et al.*, 2014); pero en su mayoría, los cactus son polinizados por 1 ó 2 grupos de polinizadores, como en *Pachycereus pringlei*, *Carnegiea gigantea* y *Lophocereus schottii* que son polinizadas por murciélagos y polillas (Fleming *et al.* 2001).

La subfamilia Cactácea: Opuntioideae se caracteriza por tener tallos articulados ya sean aplanados (por ejemplo *Opuntia*) o cilíndricos (como *Cylindropuntia*) y por presentar espinas caducas, cortas, afiladas y algunas veces barbadas, llamadas glóquidas (Anderson, 2001), se han descrito polinización principalmente por abejas (Grand y Hurd, 1979; Mandujano *et al.*, 1996), no obstante también se ha documentado en *Opuntia* la interacción con Coleoptera, Lepidoptera y algunas aves (Mandujano *et al.*, 1996; Reyes-Agüero *et al.*, 2006) y adicionalmente se ha hipotetizado que el tamaño de polinizador corresponde al tamaño de la flor (Reyes-Agüero *et al.*, 2006).

Como se abordará más adelante, los géneros que son de interés para este trabajo son *Opuntia* y *Cylindropuntia*. El género *Opuntia* presentan flores con colores atractivos, fragancias suaves y dulces, estambres numerosos con poco polen o pocos estambres con abundante polen, el gameto masculino es grande (80-140  $\mu\text{m}$ ; Belmonte *et al.*, 1986) y muy nutritivo. Pueden presentar estigmas pegajosos, con lóbulos que facilitan el aterrizaje, ocasionalmente presentan nectarios, pero siempre se produce néctar en este género (Grant y Hurd., 1979; Osborn *et al.*, 1988; Nerd y Mizrahi, 1955. En Reyes-Agüero *et al.*, 2006). Las flores de *Cylindropuntia* son en forma de copa con diámetros que van de 4 a 8 cm, de hecho, muy parecidas a las de *Opuntia*, con colores que van de amarillos, verdosos y purpúreos (Grant y Hurd, 1979).

Existen trabajos acerca de la biología de la reproducción en Cactaceae (e.g.



*Melocactus curvispinus*, Nassar y Ramírez, 2004) o en la ecología de la reproducción (e.g., *Ariocarpus fissuratus* Martínez-Peralta y Mandujano, 2011). Gran proporción de los estudios sobre el polen en la familia Cactaceae se centran en su desarrollo y descripción morfológica (e.g. en el género *Pterocactus*, Gotelli *et al.*, 2009; *Austrocylindropuntia*, *Maihueniopsis*, *Opuntia* y *Tephrocactus*, Garralla y Cuadrado, 2007); sin embargo también se han desarrollado estudios en un contexto ecológico como los hechos en flujo polínico (e.g., *Coryphanta sherii* var *robustispina*, McDonald y McPherson, 2005; *Astrophytum asterias*, Blair y Williamson, 2010; *Opuntia microdasys*, Cabrera, 2011) y en todos ellos, los autores coinciden que la densidad de flores por individuo, la distribución de individuos en la población y el tipo de polinizador que presentan influirán en la distancia y distribución que alcance el flujo polínico.

#### 1.4 Fenología

Fenología viene del griego y significa mostrar o aparecer. Es el estudio del momento en el que ocurren los eventos biológicos, principalmente en los animales y plantas (Lieth; 1974; Koch *et al.*, 2015)

El cambio de la abundancia de recursos está directamente relacionado con la fenología de las especies. La fenología es la respuesta de los organismos vivos a los cambios temporales y climáticos (Shivanna y Tandon, 2014); se dice que las especies vegetales dependen de un determinado umbral de temperatura o precipitación (Alvarado-Vázquez, 2003), sin embargo, factores bióticos como competencia, herbivoría, polinización y dispersión de semillas podrían tener un papel más importante en el desarrollo de los eventos fenológicos (Levin y Anderson, 1970; Rathcket, 1983; Murali y Ukamar, 1994; Muchhala y Thomson, 2012). Por ejemplo, Murali y Ukamar (1994), encontraron que el cambio a un porcentaje de humedad alto propicia la floración de la mayoría de las especies vegetales en un bosque tropical seco, sin embargo las especies raras tendían a florecer antes y este evento se lo atribuyeron a la posible competencia con las especies más abundantes. Otro caso es de Alvarado-Vázquez, donde la floración en un matorral xerófilo está fuertemente relacionada a la humedad, y que no se encuentra diferencias en los eventos de floración probablemente porque la diversidad de flores y recompensas disminuyen la competencia

## 1.5 Polinización

La transferencia de polen desde los órganos sexuales masculinos hacia los órganos sexuales femeninos es conocida como polinización. Esta transferencia es indispensable para la formación de frutos y semillas y es la base del intercambio genético entre las plantas (Müller, 1881; Faegri y van der Pijl, 1979; Shivanna, 2003); la incapacidad de las plantas para mover sus gametos por sí mismas ha propiciado la evolución de adaptaciones que les permiten dispersar el polen por medio de vectores abióticos externos, o por la coevolución con organismos vivos (Faegri y van der Pijl, 1979; Richards, 1986; Harder y Barrett, 1996; Domínguez y Pérez, 2013). Estos agentes polinizadores se pueden dividir en tres:

- Anemofilia. Propagación del polen por medio del viento. Este tipo de polinización prevalece en ambientes secos, como pastizales, sabanas y áreas semiáridas (Richards, 1986; Shivanna, 2003) y está representada por el 18% de las familias de las plantas con flores (Faegri y van der Pijl, 1979; Domínguez y Pérez, 2013). El polen que es dispersado por el viento se ve influido por la fuerza, la aerodinámica y la biofísica de la deposición, afectando directamente en el éxito reproductivo (Kearns e Inouye, 1993). Algunos ejemplos de plantas polinizadas por anemofilia son *Schiedea globosa* (Caryophyllaceae), *Zea mays*, *Setaria geniculata* y *Agrostis hiemalis* (Poaceae; Culley *et al.*, 2002).
- Hidrofilia. En esta polinización, el agua actúa como el vector que transporta el polen (Shivanna, 2003). Básicamente, existen dos formas de polinización hidrófila: *a*) con fecundación sobre el agua y *b*) con fecundación subacuática. En ambas varía la zona en la que germina el polen. La polinización subacuática la podemos encontrar en la especie *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) planta dioica en la cual el polen es cubierto por mucílago y arrastrado por el agua hasta colisionar con la planta femenina (Domínguez y Pérez, 2013).
- Zoofilia. En esta interacción, las plantas utilizan a los animales como vectores de sus gametos masculinos y los retribuyen con recompensas como polen, néctar, aceites y fragancias (Domínguez y Pérez, 2013). Existe un número mucho mayor de especies vegetales que son polinizadas por especies

animales (~80%; Ackerman, 1999) que por viento o agua (Shivanna, 2003), como las pertenecientes a las Familias Compositae, Convolvulaceae, Oxalidaceae y Cactaceae (Domínguez y Pérez, 2013).

Las especies zoófilas desarrollan mecanismos y estructuras florales especializadas para así atraer a los agentes polinizadores, tales como olores, colores o formas. A la especialización entre las características florales y de sus polinizadores se les reconoce como síndromes de polinización (Müller, 1881; Faegri y van der Pijl, 1979; Wyatt, 1983). Entre los animales, los insectos son los polinizadores más importantes (entomofilia); de éstos, los más comunes son las abejas (melitofilia), los escarabajos (cantarofilia), las polillas (falaenofilia) y las mariposas (psicofilia; Müller, 1881; Faegri y van der Pijl, 1979; Richards, 1986; Shivanna, 2003, Fenster *et al.*, 2004).

## 1.6 Flujo de polen

Desde una perspectiva ecológica y evolutiva, una pregunta crítica es qué tan lejos se mueve el polen en las poblaciones contemporáneas. La relevancia radica en que las plantas tienen dos oportunidades para mover sus gametos, vía polen o vía semillas (Harder y Barrett, 1996; UCLA, 2010). Los granos de polen son transportados, sea por viento, agua o polinizadores, a una mayor distancia que las semillas, por lo que el polen puede proveer de conexiones genéticas clave entre poblaciones de fragmentos naturales (UCLA, 2010). El movimiento físico de los alelos se le llama flujo génico y la distancia en la que el polen viaja desde su fuente hasta su aterrizaje se utiliza para la medida del flujo génico (Shivanna, 2003). Para las especies zoófilas, se han realizado varios estudios en los que se estima a qué distancias llega el polen dispersado, por ejemplo, en un estudio de *Primula elatior* y a través del uso de polvos fluorescentes y pruebas de paternidad se encontró que entre 74.2-94.8% del polen es depositado a menos de 50 m de distancia y es llevado principalmente por abejas y abejorros (Van-Rossum *et al.*, 2009); otro caso es el *Campanula thyrsoides*, polinizada principalmente por abejorros e himenópteros pequeños (Kuss *et al.*, 2007), que según a las pruebas de paternidad y al uso de polvos fluorescentes, en promedio tiene un flujo polínico de 17.4 m (Scheepens *et al.*, 2012); o también el caso de *Astrophytum asterias*, que de acuerdo al movimiento de los análogos de polen, el 80% del polen es depositado por los polinizadores (principalmente abejas) máximo a 30 m de la planta focal (Blair y Williamson, 2010).

En estos estudios no sólo es importante hasta qué distancias se transporta el polen, sino también hacia dónde (Waser, 1986). El movimiento polínico de las especies cuyos vectores son animales depende del movimiento de los polinizadores y a su vez el movimiento del polinizador entre las flores se ve influido por la cantidad y disponibilidad de recompensas dadas (Richards, 1986). Cuando varias especies se encuentran en floración, la disponibilidad de recursos aumenta y se puede ocurrir uno de dos escenarios 1) la floración simultánea produce facilitación y aumenta el éxito reproductivo de la especie (Thomson, 1981; Waser, 1986; Kay, 1987; Chittka *et al.*, 1999; Williams y Adam, 2010) o 2) las especies en floración entran a una competencia por polinizadores (Waser, 1978; Richards, 1986; Morales y Traveset, 2008).

La existencia de la floración simultánea puede ser consecuencia de interacciones mutualistas (Kay, 1987). Es decir, si diferentes especies de plantas comparten polinizadores generalistas, una sincronización interespecífica de la floración puede facilitar la visita de polinizadores (Thomson, 1981), además puede aumentar la fecundación cruzada o el escape de la depredación floral (Williams y Adam, 2010). Además, las especies vegetales polinizadas por agentes generalistas pueden llevar a selección por similitudes, pero no necesariamente a la especialización (Waser, 1986; Chittka *et al.*, 1999).

Según Morales y Traveset (2008) la competencia es derivada principalmente por dos mecanismos, el primero es por la preferencia de polinizador, es decir, un polinizador visitará en mayor proporción a una de las especies en floración, y la segunda, que para este trabajo toma mayor importancia, es la transferencia de polen interespecífico. La Transferencia de polen interespecífico ocurre cuando un polinizador recoge polen de una especie y lo deposita en otra especie, siendo esto producto de visitas simultáneas (Levin y Anderson, 1970; Rathcke, 1983; Morales y Traveset, 2008; Williams y Adam, 2010). Este mecanismo se divide en dos componentes, en la deposición de polen heterospecífico (PH) y en la pérdida de polen conoespecífico (PC).

La pérdida de PC es consecuencia de su deposición en flores de otras especies, en otras estructuras de las plantas o bien el polen es consumido por los visitantes

florales, lo que lleva a una reducción en la cantidad de polen transferido a flores de la misma especie (Harder, 2000; Morales y Treveset, 2008; Muchhala y Thomson; 2012), que resulta importante para el éxito reproductivo masculino ya que, según Harder (2000), sólo el 1% de polen producido por las plantas llega a otros estigmas.

La deposición de PH se traduce en dos posibles escenarios; el primero es que el PH depositado sea incompatible, lo que reduce el éxito del polen compatible y disminuye el área receptiva del estigma o por la interferencia con procesos fisiológicos, impidiendo la germinación del polen compatible (Levin y Anderson, 1970; Rathcke, 1983; Williams y Adam, 2010). Por ejemplo, a través de polinizaciones manuales, Waser y Fugate (1986) encontraron que si se deposita el polen de *Delphinium nelsonii* en los estigmas de *Ipomopsis aggregata* seis horas antes del polen de la especie receptora, el número de semillas (en adelante *seed set*) se reduciría en un 50% en comparación al *seed set* de las polinizaciones sólo con polen de *I. aggregata*; según los autores estos resultados se deben a que la presencia de polen extraño provoca el cierre de los lóbulos del estigma, acción que disminuye significativamente su receptividad. El segundo escenario es que ocurra una transferencia de PH compatible, produciendo híbridos inviables, estériles (Kay, 1987; Chittka *et al.*, 1999) o con baja adecuación. En un trabajo de Harder y colaboradores (1993) se estudió el efecto de la presencia del polen de dos especies simpátricas, *Erythronium americanum* (autoincompatible) y *E. albidum* (autocompatible), en el *fruit set* y *seed* de cada especie, encontrando que la presencia de polen de *E. albidum* en los estigmas de *E. americanum* no afectó el número de frutos ni de semillas producidas respecto al control; en cambio, la presencia de *E. americanum* en los estigmas *E. albidum* disminuyó significativamente el *seed set* respecto al control. Este estudio indica que la transferencia de polen interespecífico no tiene un efecto recíproco, pues sólo el crecimiento de tubos polínicos de *E. americanum* en *E. albidum* impidió la correcta fecundación de los óvulos para la formación de semillas. A pesar de esto, Kay (1987) propone que la hibridación puede ser una fuente importante de variación genética.

La transferencia de polen interespecífico puede llevar a la pérdida de funciones masculinas y femeninas y tener consecuencias ecológicas y evolutivas (Waser, 1978; Morales y Traveset, 2008). Para sobrellevar los procesos de la transferencia interespecífica, existen mecanismos que evitan la reducción del éxito reproductivo

de la población, sea directamente, como la diferenciación de los tiempos de floración e indirectamente, como el comportamiento constante de los polinizadores (Levin y Anderson, 1970; Waser, 1986).

La diferenciación temporal en las épocas de floración puede ocurrir cuando la especie diferenciada tiene una distribución rara (Murali y Sukumar, 1994) o en especies cercanas ((Marques *et al.*, 2007), donde se cree que este desplazamiento podría ser una adaptación para evitar el riesgo a la transferencia de PH así como la competencia por polinizadores.

El comportamiento de los polinizadores influye en la posibilidad de transferencia de polen interespecífico, como la constancia, que es la tendencia de los polinizadores a visitar solo una especie, aun cuando se presenta otra con recompensas similares (Levin y Anderson, 1970; Waser, 1986), la presencia de esta constancia o “fidelidad” puede aumentar la eficiencia de polinización (Kobayashi-Kidokoro e Higashi, 2010). Sin embargo, la constancia de las especies puede modificarse drásticamente por el cambio de la abundancia relativa de la especie visitada, es decir, a baja disponibilidad de recursos, el polinizador es capaz de alimentarse de cualquier flor sin importar la especie que visita (Levin y Anderson, 1970).

La evaluación del movimiento del polen es una tarea compleja, principalmente porque los granos de polen no son fácilmente distinguibles entre las plantas sin el uso de marcadores genéticos o morfológicos (Snow y Lewis, 1993). Por ello, se han desarrollado muchas técnicas para estimar la distancia del viaje del polen, en la Tabla 1 se muestran las más importantes.

El entendimiento de los patrones de dispersión del polen es importante para los estudios de a) flujo génico y la estructura poblacional de las plantas; b) eficiencia de los distintos polinizadores; c) evolución de los sistemas de reproducción; y d) evolución de las características florales (Waser y Price, 1982). Mediciones más directas se pueden obtener por heteromorfismos o en las especies con variedades de polen de colores distintos (Kearns e Inouye, 1993).

**Tabla 1.** Algunas técnicas para estimar distancias polínicas (Dafni, 1992 y Kearns e Inouye, 1993).

Técnica	Descripción
<b>Colorantes vitales</b>	Los granos de polen se etiquetan en la planta esparciendo (con ayuda de un atomizador, <i>spray</i> ) colorantes vitales tales como rojo neutro, azul Bismark, Naranja G y azul Evans de 1 a 2 $\mu\text{L}$ en anteras a punto de ser dehiscentes. El movimiento se determina examinando los estigmas de plantas de la población bajo microscopio.
<b>Polvos fluorescentes como análogos de polen</b>	Un colorante fluorescente es aplicado sobre las anteras dehiscentes de planta etiquetada. El movimiento de los polvos se determina examinando los estigmas de las plantas de la población bajo una lámpara de luz negra (UV)
<b>Etiquetado radiactivo del polen</b>	Se expone el polen a $^{14}\text{CO}_2$ , el cual entra al polen por medio de rutas metabólicas El movimiento del polen es seguido por la colecta de estigmas en las plantas de los alrededores y revisando la presencia de la etiqueta por medio de un “contador de centello”.
<b>Marcadores genéticos</b>	Uso de marcadores fenotípicos o moleculares para la identificación de la progenie. De los varios marcadores, el más simple y más conveniente es el fenotípico.

Como se menciona anteriormente, un modo en el que se puede medir indirectamente el flujo polínico en poblaciones naturales es marcando los granos de polen o usando análogos de polen, como polvos fluorescentes (Kearns e Inouye, 1993). La aplicación de polvos fluorescentes sobre anteras dehiscentes puede proveer la estimación del flujo de polen (Shivanna, 2003). Sin embargo, se ha visto que los colorantes pueden tener una dispersión mayor, como lo mostraron en un estudio en el que se utilizó un método en el cual compararon el flujo con el colorante aplicado al polen con pruebas de paternidad, en una población de *Erythronium grandiflorum*, Liliaceae, polinizada por *Bombus occidentalis* (Thomson *et al.*, 1986). En contraste también se ha reportado lo contrario, donde los colorantes pueden tener una dispersión menor, esto se identificó comparando los polvos fluorescente con el movimiento de uno de los dos morfos de polen de *Ipomopsis aggregata*, movido por colibríes (Campbell *et al.*, 1991). Incluso la habilidad de predecir el movimiento

puede variar entre las especies polinizadoras, esta evidencia proviene de una comparación entre cuatro especies de abejas a través de distintos colores de polvos fluorescentes, *Xylocopa virginica*, *Osmia lignaria*, *Habropoda laboriosa* *Bombus bimaculatus* y *Apis mellifera* en la polinización de *Gelsemium sempervirens*, Gelsemiaceae (Adler e Irwin, 2006).

Para este trabajo se utilizará polvo fluorescente como marcador polínico y se observará si puede predecir el flujo de polen de *Opuntia tomentosa* o más bien da una estimación diferente al movimiento real del polen en la población. Para acercarnos al flujo real de polen se optó por usar colorantes vegetales, que tiñen cada grano de polen en las anteras. De este método se hablará más adelante.

### 1.7 Calidad del polen

La capacidad dispersora de los polinizadores no es lo único que influye en el éxito reproductivo de las poblaciones vegetales, también juega un papel importante la calidad del polen que las plantas producen, ya que ésta se ve afectada antes de su liberación o después de ella. Antes de la liberación, el polen puede estar sujeto a condiciones de estrés durante el desarrollo, ser afectado por la variabilidad genética interespecífica, o por su metabolismo (Dafni y Firmage, 2000). Después de su liberación, son expuestos a las condiciones ambientales presentes en un área y durante un tiempo determinado antes de ser depositados en un estigma. Dependiendo de las condiciones y la duración de dicha exposición, la calidad del polen se verá afectada. La calidad del polen es evaluada bajo el supuesto de viabilidad y vigor (Shivanna, 2003). El vigor se refiere a la velocidad de germinación y a la tasa de crecimiento del tubo polínico. En cambio, la viabilidad se relaciona con el potencial del grano de polen de realizar su función de llevar los gametos masculinos hacia el saco embrionario (Barnabas y Kovacs en Shivanna, 2003). Se han desarrollado una serie de pruebas a través de los años para medir la viabilidad del polen (Tabla 2).

Ya que la viabilidad se refiere a la habilidad del polen de llevar a los gametos masculinos al saco embrionario, la prueba más real sería la evaluación de la capacidad de fecundación del polen medida desde el establecimiento de fruto y



semilla (*fruit set* y *seed set*), siguiendo una polinización controlada (Heslop-Harrison *et al.*, 1984). Esta técnica consiste en la emasculación y polinización manual de un estigma compatible usando el polen muestra que será probado. La contaminación del estigma por otro tipo de polen debe ser prevenida por el embolsado de la flor o manteniendo la planta en un invernadero en ausencia de insectos (Shivanna y Johri, 1985). Sin embargo, esta prueba tiene muchas limitaciones como para ser usado como una prueba de rutina: a) es laboriosa y consume de tiempo; b) muchos otros factores como la receptividad del estigma y la incompatibilidad deben ser considerados antes de aplicar esta prueba; por lo que generalmente se requiere de información previa sobre la biología reproductiva; c) la formación de semilla no es una consecuencia inevitable después de la fecundación, muchos otros factores asociados a la post-fecundación deben ser considerados en el desarrollo de la semilla; d) no puede ser utilizada en especies apomícticas (i.e., plantas con la capacidad de producir semillas en ausencia de la fecundación, pues es un tipo de propagación asexual; Stern *et al.*, 2008 ); e) sólo puede ser usada en época de floración; f) puede llegar a ser más una prueba de calidad que una de cantidad, pues se limita la germinación del polen por el número de óvulos presentes (Shivanna, 2003).

La necesidad de probar la calidad funcional del polen surge desde muchos contextos; por ejemplo, en la evaluación de la fertilidad de las plantas madre; la hibridación en experimentación genética y fitomejoramiento; en el monitoreo del polen durante su almacenamiento; en la investigación de la interacción polen-estigma, sistemas de incompatibilidad y fecundación; en la investigación de estado de hibridación esperado en individuos y en poblaciones en la ecología (Heslop-Harrison *et al.*, 1984); además, se puede evaluar el efecto de algún marcador sobre la calidad del polen.

**Tabla 2.** Descripción de algunas técnicas para evaluar la viabilidad del polen. Modificada de Shivanna, 2003.

Técnica	Descripción
<b>Establecimiento de fruto y semilla (<i>Fruit set</i> y <i>seed set</i>)</b>	La prueba más real de función del polen. La viabilidad del polen es medida por establecimiento de frutos y semillas, con ayuda de una polinización controlada.
<b>Germinación de polen y crecimiento de tubos polínicos en el pistilo</b>	Se considera como viable a aquel grano de polen que germine y presente crecimiento del tubo polínico. No siempre es factible cuantificar el número de tubos polínicos que crecen en un estigma.
<b>Colorantes no vitales y otras pruebas de uso limitado</b>	Las pruebas de tinción usando colorantes vitales tales como yoduro de potasio, azul anilina en lactofenol, acetocarmina, fucsina ácida y colorante de Alexander. Estas pruebas son efectivas en evaluar la esterilidad del polen, es una aproximación de su viabilidad porque puede dar falsos positivos.
<b>Prueba de Tetrazolio</b>	Detecta la presencia de las deshidrogenasas, enzimas producto de la respiración celular. Después de ser expuestos por 30 minutos, los granos que las posean, se tornan rojizos.
<b>Germinación <i>in-vitro</i></b>	Es el más común, además de ser rápido y simple. Es la germinación de tubos polínicos en una solución. Puede dar falsos negativos.
<b>Prueba de diacetato fluorescente (FDA)</b>	También se refieren a esta prueba como la reacción fluorocromática (FCR). Se fija en la actividad de esterasas, cuando no hay actividad de esterasas, la fluoresceína no se acumula y por tanto no brilla (polen no viable).

## 2. Objetivo

En este trabajo se estudiará el flujo del polen de *Opuntia tomentosa* con dos marcadores morfológicos: colorantes vegetales y polvos fluorescentes. El estudio se realizará en un matorral xerófilo en donde coexisten varias especies de Opuntioideae en el área silvestre del Jardín Botánico de Cadereyta, Querétaro, México.

Como objetivos particulares:

- Determinar si los colorantes y los polvos fluorescentes influyen en la viabilidad del polen.
- Comparar si existen diferencias en el movimiento, la orientación y la distancia del polen marcado con polvos y del polen marcado con colorantes.
- Identificar indirectamente si los polinizadores depositan polen de *Opuntia tomentosa* a otras especies como *O. cantabrigiensis*, *O. robusta*, *O. streptacantha* y *Cylindropuntia imbricata* (i.e., existe flujo de polen interespecífico).

## 3. Hipótesis

- La presencia de marcadores morfológicos, al tener sólo contacto externo con el polen, no tendrá un efecto sobre su calidad (que este caso es medida con la viabilidad).
- Los polvos fluorescentes darán una estimación diferente al flujo polínico real, es decir al del polen teñido con colorante.
- La existencia de una floración simultánea de las especies de Opuntioideae que están en el sitio de estudio permitirá la deposición de polen de *O. tomentosa* en las otras especies en floración, lo incrementará la transferencia de polen interespecífica.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Sitio de estudio

El Jardín Botánico Regional de Cadereyta de Montes “Ing. Manuel González de Cosío” es una institución del Gobierno Estatal fundado en 1988 y auspiciado por el Consejo de Ciencias y Tecnología en Querétaro, México (Fig. 4; CONCYTEQ; Reyes-Santiago, 2011).



Fig. 4. Mapa de ubicación del Jardín Botánico Regional de Cadereyta de Montes “Ing. Manuel González de Cosío” (rombo azul) localizado en el municipio de Cadereyta de Montes (amarillo) del estado de Querétaro (verde). Tomado de [www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)

El sitio se encuentra a una altitud de 2046 m snm y ocupa una superficie aproximada de 15.33 h (Sánchez *et al.*, 2012), la vegetación es matorral xerófito crasicaule perturbado con una ladera escarpada mejor conservada. Su geomorfología está conformada por coladas de lava riolítica, con rocas tipo arenisca-conglomerado. El clima es semiseco templado con lluvias en verano BS1kw(w), según la clasificación de Köppen (modificada por García, 2004), la temperatura mínima promedio anual es de 6.6°C y la máxima de 24.4°C, con precipitación mínima anual acumulada promedio de 309.3 mm y máxima de 798.6 mm (CONCYTEQ, 2011; SNM, 2010).

Según Sánchez y Sanaphre (2009), el jardín se divide en tres partes de acuerdo al tipo e intensidad de uso, a las condiciones físicas y biológicas y a las actividades potenciales: una zona de colecciones y unidad de propagación de plantas silvestres; una plantación de yucas de más de 60 años de edad; y una zona silvestre que comprende el área de bordo y senderos. Los experimentos de este trabajo se hicieron en la última zona mencionada.

#### 4.2 Sistema de estudio

*Opuntia tomentosa* Salm-Dyck es una planta arbustiva a arborescente de 1 a 3 m de altura. Presenta ramas abundantes formando una copa amplia. Tiene cladodios oblongos hasta angostamente ovalados, de 10 a 60 cm de longitud y con pubescencia aterciopelada. Lleva aréolas pequeñas, con glóquidas amarillas (Fig. 5a). Las espinas generalmente son ausentes, pero cuando las hay, son amarillentas de 1 a 3 por aréola (Bravo-Hollis, 1978).

Los individuos presentan flores hermafroditas de color anaranjado con tonos amarillo y rojizos, de 4 a 5 cm de longitud; filamentos blancos; estilo rosa, más largo que los estambres; lóbulos del estigma 5 ó 6 amarillos (Fig. 5b). Fruto ovoide, rojo, con semillas de 4 mm de ancho (Bravo-Hollis, 1978) y hasta 60 semillas por fruto (Galicia, 2013).



Fig. 5 a. Imagen de ejemplar de *Opuntia tomentosa* en floración, donde se observa el hábito arbustivo, los cladodios ovalados y la presencia de flores anaranjadas y botones florales. b. Acercamiento de una flor y botones, en la flor se puede apreciar el estigma amarillo y que el estilo es más largo que los estambres. Fotos: Linda Mariana Martínez Ramos.

Estas plantas florecen de marzo a mayo y fructifican de junio a agosto (González *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Galicia (2013) se reportó que esta especie presenta hercogamia (0.35 mm de distancia entre las anteras y el estigma), pero no presenta un sistema de autoincompatibilidad, pues no hay diferencias en el número de semillas formadas por autocruza o entrecruza; con esta combinación de características, se concluyó que esta población presenta un sistema de apareamiento mixto. Respecto a la polinización, se ha reportado que se da por insectos, principalmente por abejas de la familia Megachilidae (por ejemplo, *Megachile* sp.) y en menor proporción abejas de la familia Halictidae (*Lasioglossum* sp.) y Apidae, como *Bombus* sp. y la especie introducida *Apis mellifera* (Beutelspacher, 1971; Mandujano *et al.*, 2014). La especie se puede encontrar desde Guatemala hasta México. En México, sus poblaciones se distribuyen en el centro y sur del país, es decir, en el Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco y Estado de México. También se ha encontrado en Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí (González *et al.*, 2001; Guzmán *et al.*, 2003).

Otras especies que se encuentran en el sitio de estudio, es decir, en la zona silvestre del jardín y de interés para este trabajo son *Opuntia robusta* (Fig. 6a), *Cylindropuntia*

*imbricata* (Fig. 6b), *Opuntia streptacantha* (Fig. 6c) y *Opuntia cantabrigiensis* (Fig. 6d).

*Opuntia robusta* Wendland es una planta arbustiva, muy ramificada, de 1 a 2 m de altura. Los artículos son orbiculares de 15 a 40 cm de longitud, muy robustos, muy gruesos, de hasta 2.5 cm de espesor, color verde azulado claro a glauco. Las aréolas son distantes de color blanco o amarillento, las espinas son de 2 a 12 de 5 cm de longitud. Además, las flores son grandes, amarillas, de 5 a 7 cm de longitud lóbulos del estigma amarillos a blancos; los frutos son anchamente subglobosos, globosos o elípticos, de color amarillento a purpurino (Bravo-Hollis, 1978).

Se ha descrito que las poblaciones de esta especie presentan individuos femeninos, masculinos y hermafroditas (Del Castillo y González-Espinosa, 1988), sin embargo, la población del Jardín botánico sólo posee individuos masculinos y femeninos, es dioica (Galicia, datos no publicados). Las flores son diurnas y abren de uno a dos días. La época de floración es durante marzo y abril, donde los individuos masculinos florecen primero y posteriormente los femeninos (Galicia, datos no publicados). Son principalmente visitadas por abejas solitarias, coleópteros, y en raras ocasiones, por lepidópteros, hormigas y colibríes. Siendo las abejas las mejores polinizadoras, éstas pertenecen a las familias Megachilidae, Halictidae, Apidae y Andrenidae (Del Castillo y González-Espinosa, 1988). Por la presencia de dioecia, la autopolinización no ocurre. La especie se encuentra en los estados de Zacatecas, Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Guanajuato y Michoacán (Bravo-Hollis, 1978).

*Cylindropuntia imbricata* Knuth es un arbusto de hasta 3 m de altura con ramas más o menos abundantes. Presenta un tronco corto, leñoso y bien definido, de unos 10 cm de diámetro. Los artículos (tallos cilíndricos) de las plantas van de 12 a 35 cm de largo y de unos 2.5 a 3.5 cm de diámetro, los tubérculos están dispuestos en series de 3 a 4, muy prominentes, de 2 a 3.5 cm de largo. Las aréolas son grandes con glóquidas escasas y las espinas numerosas llegan a ser de 10 a 30 por aréola, extendidas en todas direcciones, rectas, de 1 a 3 cm de largo, fuertemente barbadas, con vainas blanquecinas, papiráceas y persistentes. Las flores son hermafroditas y numerosas, se encuentran en la extremidad de las ramas con 5 a 7 cm de diámetro, de color púrpura a púrpura rosado, el pericarpelo es tuberculado, con los segmentos del perianto angostamente ovalados. El fruto es tuberculado, de color amarillo y

carnoso cuando madura, no presenta espinas, tiene forma ovoide de 2.5 a 4 cm de largo. Semilla lisas, de 2.5 a 3.5 mm de diámetro y hasta 70 por fruto (Ayala, 2014). A pesar de ser un género diferente, esta especie parece tener también una polinización por abejas (Grant y Hurd, 1979). En México, *C. imbricata* Knuth se encuentra en la Ciudad de México y parte de los estados de la altiplanicie tales como México, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Coahuila, Chihuahua y Tamaulipas, extendiéndose hasta el sur de Arizona, Nuevo México y Texas (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001).

*Opuntia streptacantha* Lemaire es una planta arborescente muy ramosa que llega medir hasta 5 m de altura; sus artículos son ovalados de hasta 30 cm de longitud, de color verde oscuro. Las aréolas son pequeñas, cercanas entre sí, con espinas numerosas, blancas y las glóquidas son de color café rojizo, muy cortas. Las flores tienen de 7 a 9 cm de ancho, amarillas hasta anaranjadas, los filamentos son verdosos o rojizos, lóbulos del estigma de 8 a 12, amarillentos. El fruto es globoso, de 5 cm de diámetro, rojo oscuro (Bravo-Hollis, 1978). Estas plantas florecen entre los meses de abril y julio, y fructifican de junio a noviembre (García, 1984). Huerta (1995) ha reportado que para el valle de México, las flores llegan a abrir hasta dos días y que sus polinizadores son *Apis mellifera*, *Bombus* sp., *Diasia rinconis* y *Perdita azteca*, además se ha mencionado que la autopolinización se da por la visita de hormigas (Reyes-Agüero *et al.*, 2006). En México se distribuye en los estados de Hidalgo, Querétaro, Guanajuato, San Luis Potosí, Aguascalientes y Zacatecas (Bravo-Hollis, 1978).

*Opuntia cantabrigiensis* Lynch es una planta arbustiva, de 1 m de altura. Presenta artículos orbiculares, de 12 a 20 cm de longitud, de color verde azulado pálido. Aréolas grandes y distantes; las espinas generalmente son de 3 a 6, aciculares, amarillas con la base rojo-marrón; las glóquidas son numerosas, grandes y amarillentas. Las flores son hermafroditas con 5 a 6 cm de longitud, amarillentas con el centro rojizo, los lóbulos del estigma son alargados y de color verde. Los frutos son globosos, de color púrpura y las semillas pequeñas (Bravo-Hollis, 1978) y hasta 157 por fruto (Bowers, 1997). *O. cantabrigiensis* comienza a presentar flores a mediados de marzo y fructifica dos meses después (mayo-junio).



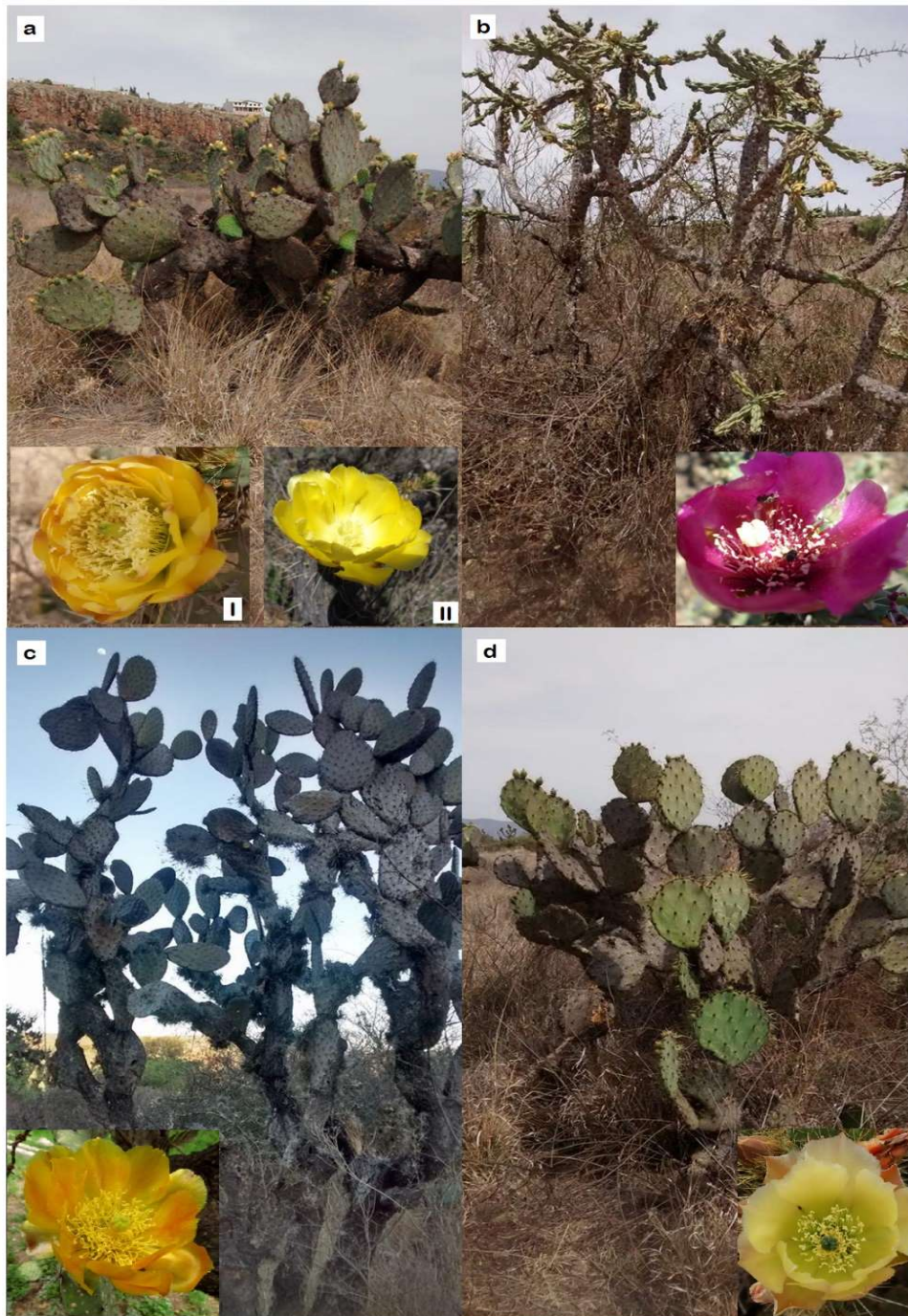


Fig. 6. Especies de la subfamilia Opuntioideae (Cactaceae) presentes en el Jardín Botánico Regional de Cadereyta. a) *Opuntia robusta*, arbusto con cladodios redondos de hasta 2.5 cm de grosor, verde azulado claro, flor masculina (I) con estambres numerosos y estigma reducido con lóbulos cerrados, y flor femenina (II) con estambres atrofiados y estigma con lóbulos amarillos, abiertos; b). *Cylindropuntia imbricata*, arbusto con artículos cilíndricos, flor púrpura con el pericarpelo tuberculado; c). *Opuntia streptacantha*, arborescente con cladodios ovalados color verde oscuro, flor amarillada con estigma con lóbulos amarillos, cerrados.; y d). *Opuntia cantabrigiensis* de porte arbustivo, con cladodios orbiculares, verdes azulado pálido, flor amarilla, con los lóbulos verdes, cerrados. Fotos: Linda Mariana Martínez Ramos.

Grant y colaboradores (1979) reportaron que los posibles polinizadores para esta especie al sur de Estados Unidos son *Diadasia rinconis*, *Ceratina dupla*, *Apis mellifera*, *Xylocopa virginica* (Apidae); *Agapostemon texanus* y *Lasioglossum pilosum* (Halictidae); y *Perdita texana* (Andrenidae). Esta especie se encuentra en San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Bravo-Hollis, 1978).

## 4.2 Diseño experimental

Se visitó la parte de vegetación nativa del Jardín Botánico de Cadereyta durante la floración de *O. tomentosa* (abril a mayo de 2014 y de abril a mayo 2015) y los experimentos realizados se dividieron en dos grandes grupos; el primero fue de pruebas de viabilidad del polen, donde se buscó estimar el efecto de los marcadores del polen sobre la viabilidad del mismo; el segundo grupo fue de flujo polínico, en el que se determinó hacia dónde se movió el polen marcado, sea hacia individuos de la misma especie (flujo intraespecífico) o de especies distintas (flujo interespecífico), y al mismo tiempo se evaluó si existe alguna diferencia entre el movimiento de polen marcado con polvos fluorescentes y del polen marcado con colorantes vegetales.

### 4.3.1 Pruebas de viabilidad

#### 4.3.1.1 Polinización controlada: *Fruit set* y *seed set*

Para evaluar si la presencia del colorante vegetal y del polvo fluorescente influye en la viabilidad del polen, se hicieron pruebas de establecimiento de frutos y semillas mediante un diseño factorial de polinizaciones controladas (Shivanna, 2003). En cada individuo ( $n = 30$ ) se tomaron tres flores al azar y se autopolinizaron aplicando los siguientes tratamientos: *a*) polen teñido con colorante vegetal, *b*) polen marcado con polvos fluorescentes y *c*) control, polen natural. Como *O. tomentosa* es 100% autocompatible en la población de estudio (Galicia, 2013), se usaron tratamientos de autogamia (polen de la flor colocado en el estigma de la misma flor) para estas pruebas. Para los tres tratamientos, primero se embolsaron los botones de las flores a usar para evitar la polinización por otros organismos, posteriormente, al momento de la antesis el estilo y estigma se protegieron con un pequeño tubo para evitar contaminación, se emascularon las flores y al polen extraído se le agregó polvo

fluorescente o colorante vegetal (según sea el caso), en el caso del control al polen no se le agregó nada, y se esparció en el estigma de la flor utilizando un pincel (Fig.7). Todos los tratamientos se mantuvieron embolsados hasta la formación del fruto.

Mensualmente se hizo el registro de la formación de frutos y éstos fueron colectados cuando maduraron. Los frutos maduros fueron disecados y las semillas contadas en cada uno. Posteriormente se evaluó si existen diferencias significativas entre la proporción de los frutos formados por tratamiento usando un modelo lineal generalizado (GLM) con función logit y distribución del error binomial (Crawley 1993) y el número de semillas formadas a través de una prueba de un modelo lineal generalizado (GLM) con función log y distribución del error Poisson (Crawley 1993).



**Fig. 7.** Polinización manual con polen teñido con colorante vegetal. El esquema muestra una vista longitudinal de la flor en donde se indica que el estigma se cubre con la mezcla de polen y marcador, en este caso, colorante (izquierda). Acercamiento de una flor en la que se nota la manera en la que se cubría el estilo y el estigma para impedir polinización al momento de emasculación (derecha). Esquema tomado y modificado de Galicia, 2013. Foto: Linda Mariana Martínez Ramos.

#### 4.3.1.2 Azul de anilina en lactofenol.

El polen debe teñirse de un azul oscuro para considerarse viable en comparación al polen no viable que queda de color azul tenue (Anexo1. Técnica tomada y modificada de López *et al.*, 2005; ver resultados). Este reactivo se preparó 15 días antes de la experimentación, siguiendo los requerimientos de esta técnica y se utilizó

durante los meses de abril y mayo del 2015. La viabilidad del polen se evaluó en 30 flores (diferentes a las usadas en el experimento anterior) abiertas de individuos distintos. Al medio día, se tomaron de cada flor tres porciones de polen de anteras intactas para que a cada una se le aplique un tratamiento: *a*) colorante vegetal, *b*) polvos fluorescentes y *c*) control, polen natural. La manera en la que se preparó cada muestra es la siguiente: se colectó una antera de una flor, se extrajo el polen con una aguja de disección y se colocó en un portaobjetos, se añadió una gota de agua y se esperó un minuto, posteriormente se agregó una gota de lactofenol con azul de anilina y se esperó por un minuto para realizar los conteos. Los conteos se realizaron a través de observaciones por campo usando un microscopio estereoscópico (20×) y se expresaron como una proporción de polen viable/polen total.

#### 4.3.1.3 Tinción de Alexander

La prueba de viabilidad de polen con la Tinción de Alexander se realizó con un reactivo preparado que fue proporcionado por el laboratorio de Desarrollo de Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM. En esta prueba la exina del polen debe teñirse de verde-amarillo y las aperturas de rosa intenso para considerar un grano viable (López *et al.*, 2005; ver resultados). Se utilizó el polen de 15 flores del experimento anterior, de cada flor se utilizaron tres porciones de polen y se aplicaron los mismos tratamientos que la prueba con azul de anilina. Para cada muestra se realizó lo siguiente: en un portaobjetos se preparó una porción de polen con una gota del tinte, esta mezcla se esparce de manera uniforme en el portaobjetos y se expuso unos segundos al calor. El conteo se realizó por bandas (observación de una fila de campos que están a lo largo del portaobjetos) y a través de un microscopio óptico en un aumento de 10× y 40×. También se obtuvieron los porcentajes de polen viable y de polen inviable.

Para probar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de polen viable de los tratamientos (colorante, polvo y control) en cada tinción, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon.

### 4.3.2 Flujo de polen

Para seguir el movimiento del polen se seleccionó una planta (focal) por la mañana (10:00 h) y se pintó el polen de cada una de sus flores con ambos marcadores (colorantes vegetales y los polvos fluorescentes). A partir de la planta focal se hizo un mapa en el que se localizaron y etiquetaron, tomando la orientación angular y la distancia respecto a la focal, todos los individuos de Opuntioideae ubicados dentro del vecindario, una parcela circular con un radio de 30 m (Fig. 8a). Posteriormente, en la tarde y previo al cierre de las flores, se realizaron recorridos de exploración de las parcelas circulares de cada planta focal. Todas las flores del vecindario que abrieron ese día, de los géneros *Opuntia* y *Cylindropuntia*, se colectaron y etiquetaron para ser revisadas en el laboratorio y detectar el polen teñido o el polvo fluorescente; todo esto para localizar hacia dónde y a qué distancia viajó el polen a través de los polinizadores (Fig. 8b); cada uno de estos recorridos se le asignó el nombre de vecindario y en total se hicieron 30 vecindarios. La inspección de cada flor se realizó de manera minuciosa con un microscopio estereoscópico, bajo luz negra para buscar polvos fluorescentes y bajo luz blanca para buscar colorantes, y en el mismo día de la colecta, los registros son de presencia/ausencia por flor-especie.

#### 4.3.2.1 Fenología

En este estudio se llevó un registro del número de flores abiertas de las diferentes especies de Opuntioideae que se encontraban en los vecindarios. Con este registro, se hicieron dos tablas de contingencia. La primera tabla se realizó para ver si la frecuencia de flores abiertas depende de la especie de *Opuntia* o *Cylindropuntia*, con cinco categorías de especie (*O. tomentosa*, *O. cantabrigiensis*, *O. robusta*, *O. streptacantha* y *C. imbricata*) y con un total de 2051 flores abiertas observadas; teniendo como hipótesis que todas las especies tienen la misma frecuencia. La segunda tabla se realizó para encontrar si la presencia de marcador y la especie que florece son variables independientes o si más bien presentan una asociación; se usaron cuatro categorías de especie (*O. tomentosa*, *O. cantabrigiensis*, *O. robusta* y *O. streptacantha*) y cuatro categorías de presencia y tipo de marcador (número de flores con polvo, número de flores con colorante, número de flores con polvo y colorante, y número de flores sin marcador). Para cada tabla se hizo un análisis de  $\chi^2$ . (Everitt, 1977).

#### 4.3.2.2 Distribución angular de las flores

Con los ángulos obtenidos de las flores abiertas en los vecindarios se calculó estadística circular para cada especie en cuatro categorías de frecuencia: a) flores con polen marcado con colorante y polvo fluorescente, b) flores sólo con polen marcado con polvo fluorescente, c) flores sólo con polen marcado con colorante, y d) flores que no presentaron tipo de marcador (ninguno). En la estadística descriptiva se obtuvieron los siguientes valores (Mahan, 1991; Zar, 2010):

- $r$ : Denominador angular promedio. Es la medida de dispersión más importante en datos direccionales. Si las distintas direcciones (ángulos) están estrechamente agrupadas, el valor de  $r$  será 1; si los valores están muy dispersos,  $r$  será prácticamente 0.

$$r = \sqrt{X^2 + Y^2}$$

Los valores de  $X^2$  y  $Y^2$  se obtienen a partir de

$$X = \frac{\sum \cos(a)}{n} \quad Y = \frac{\sum \text{sen}(a)}{n}$$

Donde  $a$  es el valor de cada ángulo, y  $n$  es el número total de ángulos

- $s$ : Desviación angular. Batschelet (1981) menciona que es análoga a la varianza en estadística lineal, por lo que si aumenta la dispersión de los datos angulares, la varianza aumentará. Ésta se define como

$$s = \frac{180^\circ}{\pi} (2\sqrt{1-r})$$

- $\bar{a}$ : Es la dirección promedio de los datos. Sin embargo, esta media no puede ser obtenida por medio de la suma de los ángulos y divididos por el total, más bien se encuentra a partir del seno y coseno del ángulo  $\bar{a}$ , es decir,

$$\sin(\bar{a}) = \frac{Y}{r} \quad \cos(\bar{a}) = \frac{X}{r}$$

Estos valores son utilizados para encontrar a  $\bar{a}$  en tablas de funciones trigonométricas.

#### 4.3.2.3 Distancia del flujo

Para probar si existe un efecto de la especie que florece y el tipo de polen marcado (polvo o colorante) sobre la distancia a la que se dispersó el polen desde la planta focal, se realizó una ANOVA de dos vías (Zar, 2010).

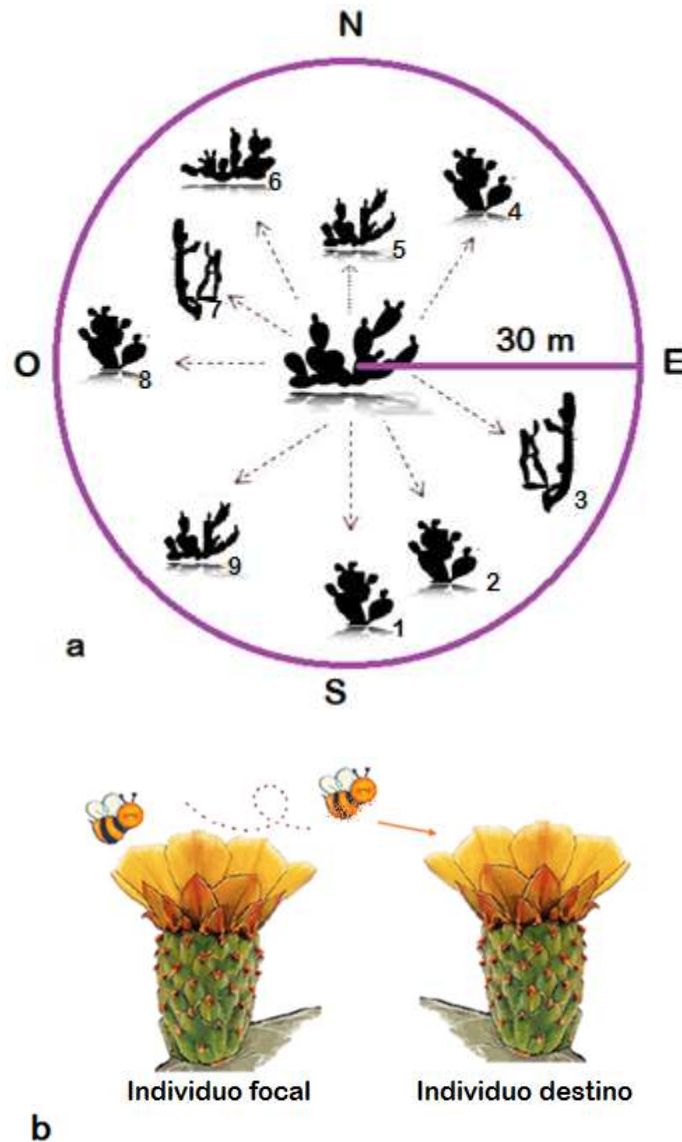


Fig. 8 a) Vecindario reproductivo hipotético que muestra la circunferencia de radio de 30 m que fue trazada donde la planta del centro representa a la planta focal (especie focal= *Opuntia tomentosa*), el resto a las especies que están en floración (*Opuntia* spp. y *Cylindropuntia imbricata*) y en las que se evaluó el movimiento del polen marcado, asignándole un número, también identificando la distancia y el ángulo en los que se encontraba la planta respecto a la focal y tomando la especie a la que se deposita el polen marcado b) Representación de la transferencia de polen de flor a flor a través de un polinizador. Esquema de flor tomado y modificado de Galicia, 2013.

#### 4.3.2.4 Correlaciones

Se analizó si hay alguna correlación entre las variables medidas de todos los vecindarios para evaluar asociaciones entre variables del vecindario y la deposición del polen marcado, a continuación se describen las abreviaturas usadas y la definición de la variable:

- $N_{rep}(sp)$ = número de individuos reproductivos
- $N_{polvo}(sp)$ = número de individuos reproductivos con polen con polvo fluorescente
- $N_{color}(sp)$ = número de individuos reproductivos con polen teñido con colorante vegetal
- $f(sp)$ = número de flores en cada especie
- $f(sp)_{polvo}$ = número de flores de cada especie con polen con polvo fluorescente
- $f(sp)_{color}$ = número de flores de cada especie con polen teñido con colorante vegetal

Estas correlaciones se analizaron a través de un análisis multivariado con el programa JMP estimando la correlación entre:  $N_{rep}(sp)$  número de individuos reproductivos,  $N_{polvo}(sp)$  número de reproductivos con flores con polvo,  $N_{color}(sp)$  número de reproductivos con flores con colorante,  $f(sp)$  número de flores por especie,  $f(sp)_{polvo}$  número de flores de cada especie con polvo,  $f(sp)_{color}$  número de flores de cada especie con colorante vegetal. Debido al tamaño de la muestra y a que las variables no son continuas se hicieron pruebas no paramétricas de correlaciones  $\rho$  de Spearman.

## 5. Resultados

### 5.1 Pruebas de viabilidad

#### 5.1.1 Polinización controlada: *Fruit set* y *seed set*

Las polinizaciones se realizaron del 27 de abril al 16 de mayo de 2015. Los frutos se colectaron del mes de octubre al mes de noviembre, según su estado de maduración. De las 90 polinizaciones realizadas, cuatro frutos fueron abortados (tres del



tratamiento de Colorantes y uno del tratamiento de Polvo) y nueve fueron depredados y no se obtuvo su número de semillas (tres del Control, cuatro de Polvo y dos de Colorante).

En total se formaron 30 frutos para el Control, 29 para el tratamiento con Polvos fluorescentes y 27 para el tratamiento con Colorante vegetal (100%, 96.66% y 90%, respectivamente). El GLM mostró que no existen diferencias significativas en el *fruit set* entre los tres tratamientos ( $\chi^2=4.454$  g.l.=2,  $P=0.1079$ ).

Los frutos del Control (autogamia con polen natural) presentaron en promedio  $72.56 \pm 14.32$  semillas, los frutos producidos en los tratamientos de autogamia usando polen teñido con Polvo fluorescente tuvieron un promedio de  $60.96 \pm 20.14$  semillas y los frutos producidos en los tratamientos de autogamia usando polen teñido con Colorante un promedio de  $45.07 \pm 27.48$  semillas. Cualquier tinción redujo el número de semillas producidas y de acuerdo al GLM, existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $\chi^2=180.14$  g.l.=2,  $P<0.0001$ ), por lo que se hicieron contrastes entre los tratamientos y se encontraron diferencias significativas entre los tres (Tabla 3).

**Tabla 3.** Estadísticos obtenidos a través de GLM, en un análisis de contrastes donde CV=Colorante vegetal, PF=Polvo fluorescente y CN=Control.

Tratamientos			X <sup>2</sup>	g.l.	P
CN	vs	PF	26.68	1	<0.0001
CN	vs	CV	178.43	1	<0.0001
PF	vs	CV	64.56	1	<0.0001

### 5.1.2 Azul de anilina en lactofenol

Se contó el polen viable de un total de 30 campos por cada uno de los tratamientos. Los porcentajes de polen viable se determinaron por medio de la división del número de granos de polen pintados de azul oscuro entre el número total de granos de polen (Tabla 4). Para averiguar si los datos presentan normalidad se usó una prueba de Shapiro-Wilk y se encontró que no hay una distribución normal en los datos ( $P < 0.05$ ). Por ello se realizó una prueba de Kruskal-Wallis.

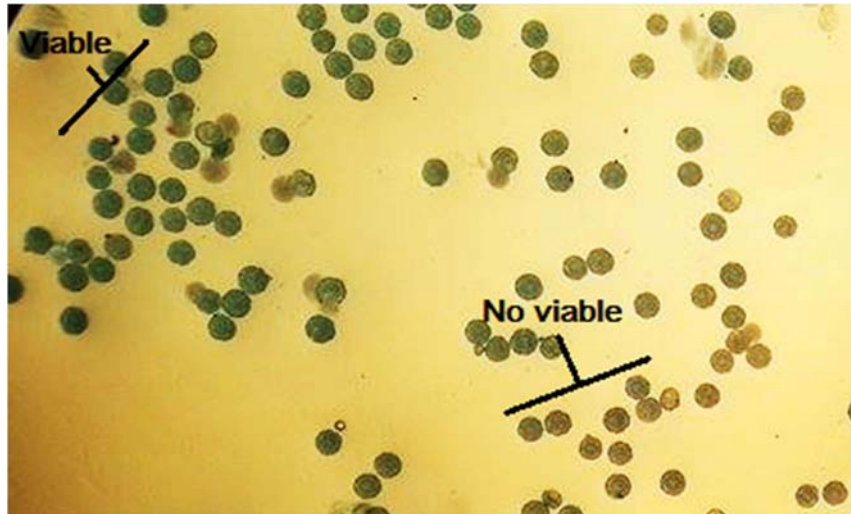


Fig. 9. Granos de polen de *Opuntia tomentosa* en la técnica de tinción de azul de anilina con lactofenol, donde los granos de color azul oscuro son considerados viables y los no viables son incoloros o azul tenue (Aumento 20x). Nota: En la fotografía los granos tomaron una coloración verde azulada, pero en el momento de la evaluación el color observado si fue azul.

**Tabla 4.** Porcentaje de polen viable de *Opuntia tomentosa* según la prueba de azul de anilina en lactofenol. Donde el Control no tuvo ninguna manipulación, el tratamiento Colorante los granos se tiñeron con colorante vegetal y en tratamiento Polvo se tiñeron con polvos fluorescentes.  $n=30$

Tratamiento	Promedio de polen viable (%)
Control	79.80
Colorante vegetal	83.30
Polvos fluorescentes	71.73

Según la prueba de Kruskal-Wallis, existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.0089$ ), para saber entre cuáles tratamientos presentan estas diferencias se realizaron comparaciones múltiples con el método de Wilcoxon y se encontró que la viabilidad de polen con Polvo Fluorescente es menor que la viabilidad del polen Control, y la viabilidad del polen teñido con Colorante Vegetal (Tabla 5).

**Tabla 5.** Comparaciones múltiples con el método de Wilcoxon entre los tratamientos de tinción de polen y el polen natural de *Opuntia tomentosa* en la prueba de azul de anilina. Donde CV=Colorante vegetal, PF=Polvo fluorescente y CN=Control, con un  $\alpha = 0.05$ . Los asteriscos (\*) indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Nivel		Nivel		P
CV	Vs	CN		0.4030
PF	Vs	CN		0.0126*
PF	Vs	CV		0.0063*

### 5.1.3 Tinción de Alexander.

Los porcentajes se obtuvieron de igual manera que en la prueba de azul de anilina con lactofenol (Tabla 6). También se probó la normalidad de los datos con una prueba de Shapiro-Wilk y se encontró que no presentan una distribución normal ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 6.** Porcentaje de polen viable de *Opuntia tomentosa* según la prueba de tinción de Alexander. Donde el Control los granos no tuvieron ninguna manipulación, el tratamiento Colorante se tiñeron con colorante vegetal y el tratamiento Polvo se tiñeron con polvos fluorescentes. n=15

Tratamiento	Promedio de Polen viable (%)
Control	64.20
Colorante vegetal	56.30
Polvos fluorescentes	71.60



**Fig. 10.** Granos de polen de *Opuntia tomentosa* en la técnica de tinción de Alexander. En esta técnica la pared de todos los granos se tiñen de verde-amarillo, pero los granos considerados como viables presentan las aperturas con un color rosa intenso (Aumento 10x).

Según la prueba de Kruskal-Wallis, existen diferencias significativas entre los tratamientos de tinción del polen de *Opuntia tomentosa* ( $P= 0.0008$ ), y de acuerdo a la prueba Wilcoxon se encontraron diferencias entre los tratamientos de Polvo Fluorescente y Colorante Vegetal y entre el tratamiento de Colorante con el Control (Tabla 7).

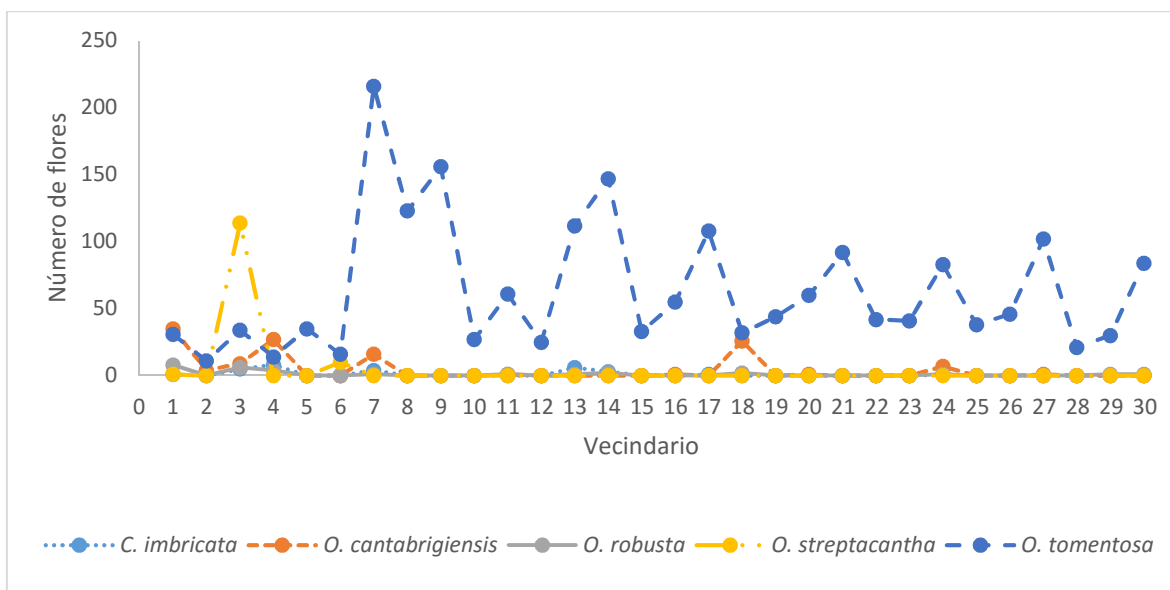
**Tabla 7.** Comparaciones múltiples con el método de Wilcoxon entre los tratamientos de tinción de polen y el polen natural de *Opuntia tomentosa* en la tinción de Alexander. Donde CV=Colorante vegetal, PF=Polvo fluorescente y CN=Control , con un  $\alpha = 0.05$

Nivel		Nivel	<i>P</i>
CV	vs	CN	0.0128*
PF	vs	CN	0.6933
PF	vs	CV	0.0001*

## 5.2 Flujo de polen

### 5.2.1 Tablas de contingencia

Con los datos obtenidos de la floración, se realizó un gráfico de frecuencia de flores por cada vecindario reproductivo analizado (Figura 11).



**Fig. 11. Frecuencia de flores en cada vecindario reproductivo. Cada vecindario es un reflejo del cambio en el tiempo del número de flores. Sólo en los primeros vecindarios registrados se observó un número considerable de flores de las cuatro especies.**

Se realizó una prueba de  $\chi^2$  para ver si la frecuencia de flores abiertas es un atributo independiente de las especies. Se encontró que la frecuencia de las flores depende de la especie  $\chi^2(4, n=2243)=6416.15, P<0.05$ , pues de las 2051 flores registradas, el 87.71% perteneció a *O. tomentosa* y las especies con menor número de flores registradas fueron *C. imbricata* (1.16%) y *O. robusta* (1.27%; Fig. 12).

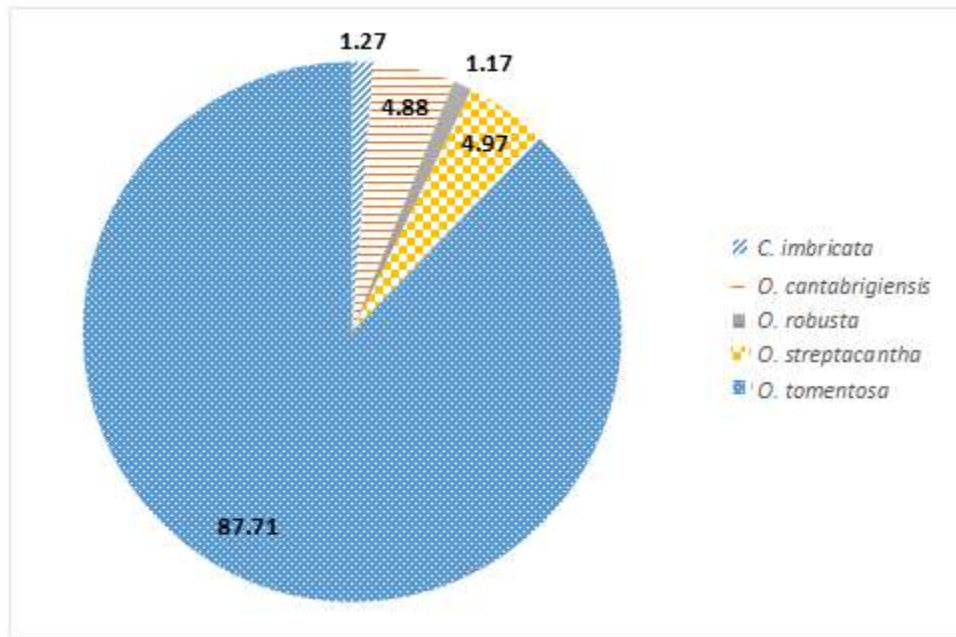


Fig. 12. Porcentaje de flores abiertas por especie de un total de 2051 flores registradas. Donde 1799 flores pertenecieron a *Opuntia tomentosa*, 26 a *Cylindropuntia imbricata*, 100 a *Opuntia cantabrigiensis*, 24 a *Opuntia robusta*, y 102 a *Opuntia streptacantha*.

Para detectar si la presencia de polen marcado es independiente de la especie que florece, también se hizo una prueba de  $\chi^2$  descartando a la especie *C. imbricata*, debido a la baja frecuencia de flores con polen marcado de Polvo fluorescente o Colorante (sólo tres flores presentaron polen marcado con Colorante). En esta prueba se vio que efectivamente existe una asociación entre la variable especie y la variable presencia de polen marcado,  $\chi^2(9, n=2243)=6416.15, P<0.05$ , pues 90.94% de las flores con algún marcador fueron de *O. tomentosa* (Tabla 8).

**Tabla 8.** Número de flores por especie de *Opuntia* que se encontraron con 1) sólo polvo fluorescente, 2) sólo colorante vegetal, 3) ambos marcadores y 4) sin algún marcador (nada).

	<i>O. cantabrigiensis</i>	<i>O. robusta</i>	<i>O. streptacantha</i>	<i>O. tomentosa</i>	<i>C. imbricata</i>
Flores con polvo	20	0	11	473	0
Flores con colorante	11	1	35	108	3
Flores con polvo y colorante	19	4	50	935	0
Nada	50	19	6	283	23
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>24</b>	<b>102</b>	<b>1799</b>	<b>26</b>

### 5.2.2 Distribución angular de las flores

Se calculó para cada especie estadística circular de cuatro categorías: a) flores con colorante y polvo fluorescente, b) flores sólo con polvo fluorescente, c) flores sólo con colorante, y d) flores que no presentaron marcador (ninguno; Fig. 13). *Cylindropuntia imbricata* sólo presentó 3 flores marcadas, de las 26 flores registradas, con colorante a  $254^\circ$ , las flores que no presentaba marcador poseen una media angular de  $231^\circ$  y una desviación angular ( $s$ ) de 52.94; los resultados para las demás especies se enlistan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Estadísticos circulares básicos de la distribución de flores de las especies de *Opuntia* en las categorías de presencia de flores con polen teñido con colorante y polvo fluorescente (flores con ambos), flores con polen teñido sólo con polvo fluorescente, flores con presencia de polen teñido sólo con colorante, flores que no presentaron marcador (ninguno) y el total de flores que se revisaron.

		Flores con ambos	Flores con polvo	Flores con colorante	Ninguno	Total
<i>Opuntia cantabrigiensis</i>	<i>n</i>	19	20	11	50	100
	$\bar{\alpha}$	219°	80°	311°	191°	195°
	<i>r</i>	0.37	0.36	0.51	0.43	0.22
	<i>s</i>	64.45°	64.61°	56.84°	61.11°	71.44°
<i>Opuntia robusta</i>	<i>n</i>	4	-	1	19	24
	$\bar{\alpha}$	45°	-	184°	294°	52
	<i>r</i>	0.50	-	-	0.07	0.42
	<i>s</i>	57.15	-	-	78.22	61.89
<i>Opuntia streptacantha</i>	<i>n</i>	50	11	35	6	102
	$\bar{\alpha}$	228°	251°	229°	8°	234°
	<i>r</i>	0.86	0.89	0.91	1	0.78
	<i>s</i>	30.49°	26.69°	24.40°	0	37.95°
<i>Opuntia tomentosa</i>	<i>n</i>	673	473	108	283	1537
	$\bar{\alpha}$	254°	202°	70°	198°	206°
	<i>r</i>	0.08	0.32	0.29	0.19	0.14
	<i>s</i>	77.65°	66.92°	68.20	72.93	75.08

Donde *n* es cantidad de flores,  $\bar{\alpha}$  es la media angular de flores de cada categoría, *r* es la concentración de los datos de cada categoría y *s* es la desviación angular.



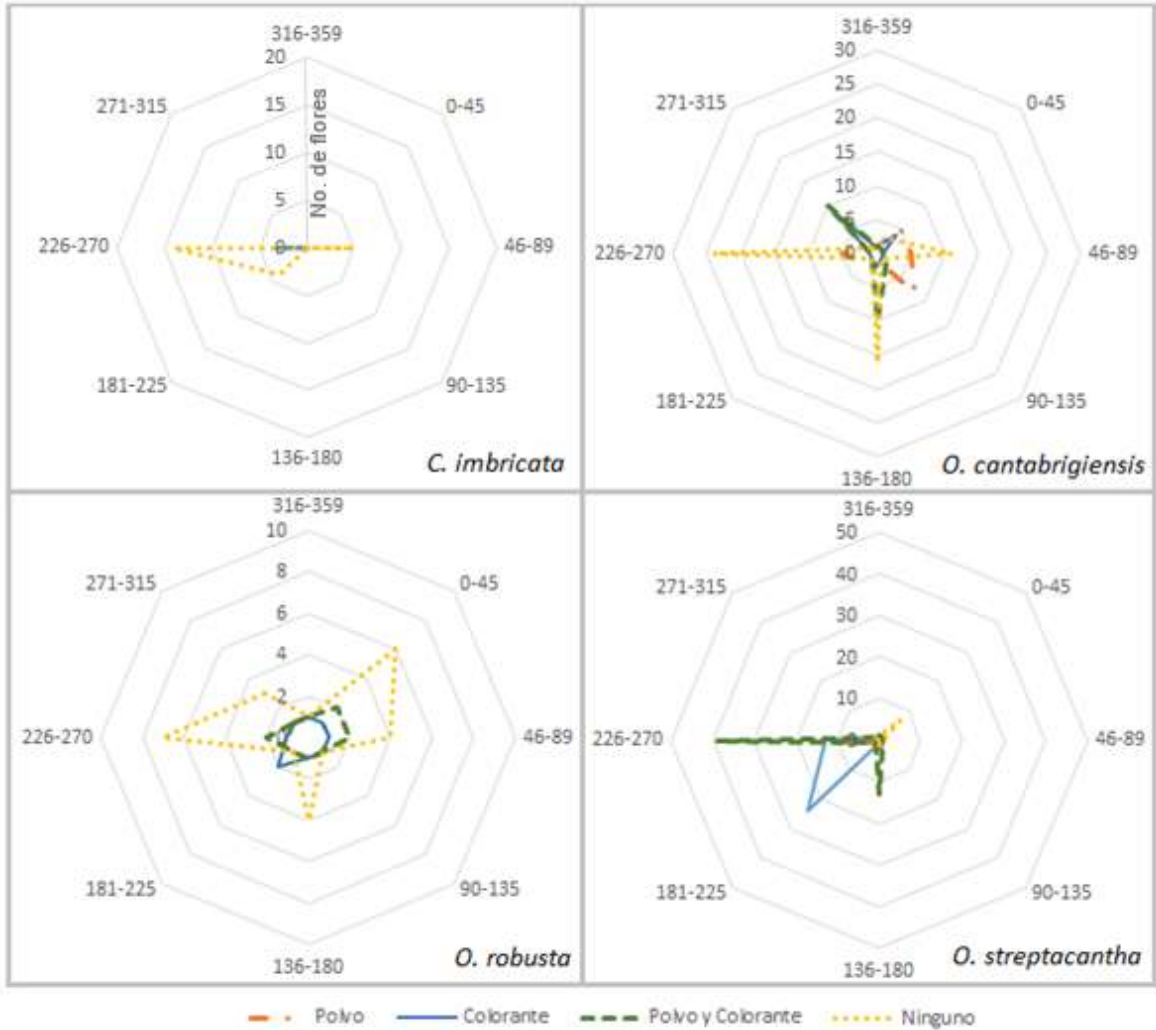


Fig. 13. Orientación y número de flores por especie (*Cylindropuntia imbricata* y *Opuntia* spp.) en las distintas categorías: flores con colorante y polvo fluorescente (verde), flores sólo con polvo fluorescente (naranja), flores sólo con colorante (azul) y flores que no presentaron marcador (ninguno, amarillo) en los vecindarios reproductivos. Para referencia de los estadísticos circulares, ver Tabla 9.

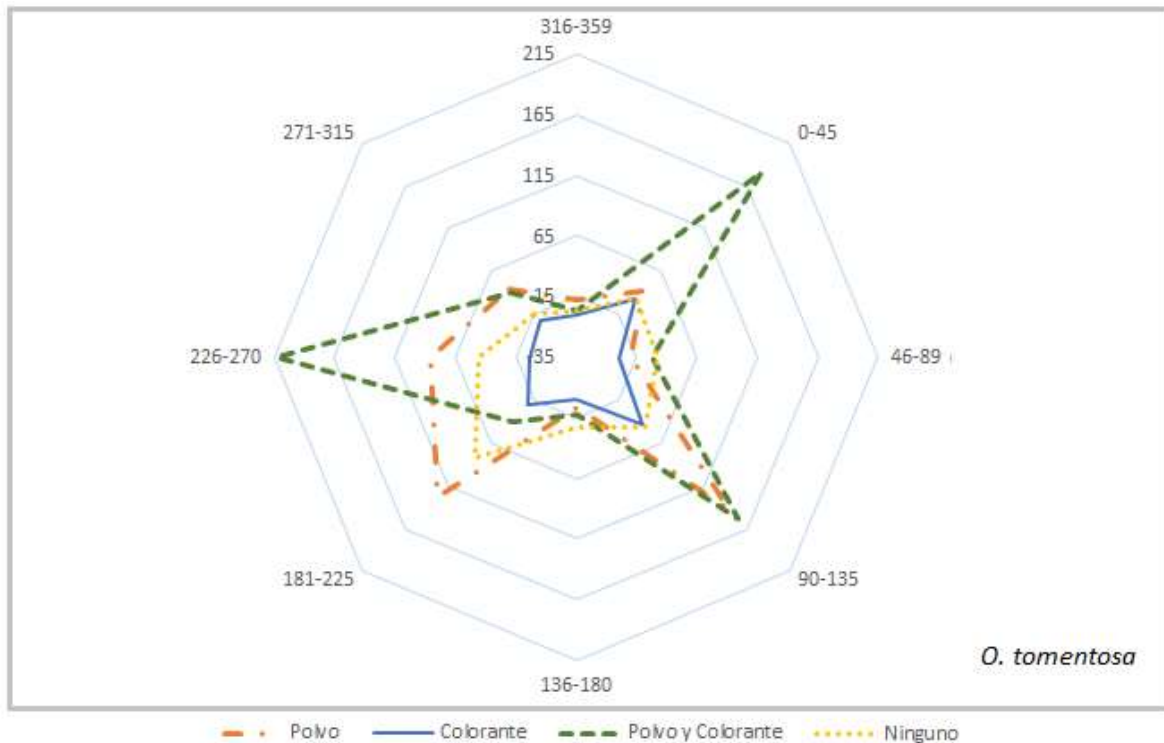


Fig. 13. Continuación. Orientación y frecuencia por especie (*Cylindropuntia imbricata* y *Opuntia* spp.) de las flores en las distintas categorías: flores con colorante y polvo fluorescente (ambos, verde), flores sólo con polvo fluorescente (naranja), flores sólo con colorante (azul) y flores que no presentaron marcador (ninguno, amarillo) en los vecindarios reproductivos. Para referencia de los estadísticos circulares, ver Tabla 9

### 5.2.3 Distancia del flujo

Se realizó una ANOVA de dos vías para probar el efecto de la especie y el marcador sobre la distancia a la que se dispersó el polen de la planta focal, se descartó a *C. imbricata* para este análisis debido a que no se tenían datos suficientes. No se presentó un efecto del tipo de marcador que se usó en las distancias alcanzadas  $F_{(1,145)}=2.69$   $P=0.102$ , ni de la interacción entre el tipo de marcador y la especie  $F_{(5,145)}=1.64$   $P=0.153$ ; pero se encontró un efecto de la especie sobre la distancia del polen  $F_{(2, 145)}=5.78$ ,  $P=0.0038$ . Para *O. cantabrigiensis* se encontró una distancia promedio de 19.053 m, para *O. robusta* 22.825 m, para *O. streptacantha* 16.026 m y para *O. tomentosa* 22.440 m. A través de una prueba Tukey HSD se buscó entre qué especies existe diferencias significativas sobre las distancias alcanzadas por el polen de la planta focal, donde *O. streptacantha* y *O. tomentosa* son significativamente diferentes ( $P=0.02$ ), es decir, la especie a la que el polen marcado viajó a menor distancia fue *O. streptacantha* y a la que el polen marcado viajó a mayor distancia fue *O. tomentosa*.

## 5.2.4 Correlaciones

Se encontró que existe una relación positiva entre el número de individuos reproductivos de cada especie con el número de reproductivos con polen marcado (con polvo o colorante, Tabla 9); es decir, a mayor número de individuos reproductivos, mayor número de individuos reproductivos con polen marcado. Mismo comportamiento que se observó entre el número de flores por especie contra el número de flores por especie con polen marcado (Mientras mayor sea el número de flores abiertas, mayor es el número de flores con polen marcado, Anexo 2). La única relación negativa que fue significativa ocurrió entre el número de flores de *O. streptacantha* contra el número de flores de *O. tomentosa* con polen marcado, sea con polvo o colorante (Anexo 2), lo que dice que a mayor número de flores *O. streptacantha*, menor es la incidencia de polen marcado en *O. tomentosa*.

**Tabla 9.** Estadístico  $\rho$  de Spearman, donde sólo se muestran las correlaciones significativas del análisis multivariado para el número de reproductivos contra el número de plantas con polen marcado.

Variable	Por variable	$\rho$ de Spearman	Prob>   $\rho$
<b>NpolvoOcan</b>	NrepOcan	0.7492	<.0001
<b>NpolvoOrob</b>	NrepOrob	0.6303	0.0002
<b>NpolvoOstre</b>	NrepOstre	0.8392	<.0001
<b>NpolvoOtom</b>	NrepOtom	0.7872	<.0001
<b>NcolorOcan</b>	NrepOcan	0.6211	0.0002
<b>NcolorCimb</b>	NrepCimb	0.3741	0.0417
<b>NcolorOrob</b>	NrepOrob	0.5743	0.0009
<b>NcolorOstre</b>	NrepOstre	0.7067	<.0001
<b>NcolorOtom</b>	NrepOtom	0.6456	0.0001

Npolvo= = número de plantas reproductivas con polen marcado con polvo fluorescente  
 Ncolor= = número de plantas reproductivas con polen marcado con colorante vegetal.  
 Y se utiliza la abreviatura de la especie de Opuntioidea como Ocan= *O. cantabrigiensis*;  
 Orob= *O. robusta*; Ostre= *O. streptacantha*; Otom= *O. tomentosa*; Cimb= *C. imbricata*.

## 6. Discusión

En este estudio se evaluó el flujo de polen de *Opuntia tomentosa* a través de dos métodos de marcaje: polvo fluorescente y colorante vegetal. Esto para saber si los análogos de polen (i.e. polvos fluorescentes) estiman un flujo polínico diferente al real (que en este trabajo fue medido con colorantes vegetales) en los vecindario reproductivos estudiados; de acuerdo a la frecuencia de flores por especie, a la distribución angular de las flores con marcador y a la distancia de los mismos. En el sistema evaluado, no existen diferencias significativas entre los marcadores, sin embargo, la presencia de los marcadores pueden afectar negativamente el desempeño del polen.

### 6.1 Pruebas de viabilidad

Encontramos que los métodos de marcaje disminuyen el *fruit set* y el *seed set*. Las polinizaciones controladas muestran que se disminuye en 10% la formación de frutos en el tratamiento de tinción con colorante vegetal y 3.33% en el tratamiento de polvos, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, aunque son cualitativas en una evaluación global dado que se mantiene el mismo patrón en todos los resultados. Respecto al *seed set*, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, donde se observó una clara disminución en el número de semillas en relación al control, pues en el tratamiento de polvos fluorescentes el número de semillas disminuyó un 16% y en el tratamiento con colorante vegetal cerca de un 38%.

En el caso de las tinciones, encontramos que para el azul de anilina el porcentaje de polen viable con polvo fluorescente (71.73%) es el que más difiere del control (79.80%), y en la tinción de Alexander el porcentaje que más difiere del control

(64.20%) es el de colorante vegetal (56.30%). Lo descrito en ambas tinciones marca la ambigüedad que pueden tener los criterios de evaluación de cuándo un grano ya no es viable (Rejón *et al.* 2010), pues éstos llegan a tomar coloraciones intermedias que ponen en conflicto al evaluador. Sin embargo, al tomar a las pruebas en conjunto, podemos decir que la presencia de colorante vegetal afecta significativamente y negativamente la formación de semillas, lo que se debe tomar en consideración si se desea aplicar como método de marcaje polínico, sobre todo en poblaciones que se ven limitadas por polen, es decir, aquellas donde se producen menos frutos o semillas de las que se producirían si la recepción de polen fuera adecuada (Knight *et al.*, 2005). La utilización de los colorantes podría reducir la viabilidad de los granos marcados, como se observó en *Opuntia tomentosa*, que para la prueba de azul de anilina el porcentaje de granos viables se redujo 8%, para la tinción de Alexander 12.3% y el número de semillas formadas disminuyó un 38%. El efecto que tienen los marcadores sobre el desempeño del polen no es un factor que se tome en consideración en los estudios de flujo de polen revisados (ver Waser y Price, 1982; Thomson *et al.*, 1986; Adler e Irwin, 2006; Van-Rossum *et al.*, 2009) sin embargo nosotros proponemos que sea un requisito para los mismos, pues puede tener un efecto negativo en la población. Adicionalmente, se debe considerar el desempeño de las semillas, pues cabe la posibilidad de que se presente un efecto tardío de los marcadores sobre la germinación y el crecimiento (Lacey, 1996). El marcaje con colorantes vegetales tiene limitaciones, pues además de afectar a la viabilidad de los granos de polen, su utilización también requiere de la exploración minuciosa de cada flor abierta para poder ubicar los granos de polen pintado, lo cual implica un esfuerzo de horas hombre de 5-10 min/flor, en comparación a 2 min/flor con el polvo fluorescente bajo luz negra (Martínez Ramos obs. pers.).

Por lo anterior, el uso de colorantes vegetales como marcador mostró mayores desventajas respecto a los polvos fluorescentes. No obstante, una evaluación completa debe incluir el potencial efecto que tienen estos marcadores en los

polinizadores. La composición de los colorantes por ser vegetales y de origen natural puede ser una ventaja, en contraste a los polvos fluorescentes que son de plástico.

## 6.2 Flujo de polen

### 6.2.1 Tablas de contingencia y Fenología floral

Durante el estudio, se presentaron flores de las cinco especies, sin embargo, la frecuencia de flores abiertas de cada una fue distinta, siendo *O. tomentosa* la que tenía más flores (80.13%), seguida de *O. streptacantha* (4.97%), *O. cantabrigiensis* (4.88%), *O. robusta* (20.83%) y *C. imbricata* (11.54). El flujo de polen se empezó a medir cuando inició la floración de *O. tomentosa* (abril a mayo), momento en el que la floración de las demás especies era mucho menor (fig. 11).

Las plantas del desierto exhiben fenologías fuertemente relacionadas a la disponibilidad de humedad, temperatura, fotoperiodo y disponibilidad de nutrientes (Alvarado-Vázquez, 2003); por lo que era de esperarse que la aparición de flores fuera simultánea entre las Opuntioideae en las condiciones adecuadas. Las especies de esta subfamilia generalmente tienen una única temporada reproductiva durante la primavera (solamente las especies cultivadas pueden presentar otra fenología, pues son obligadas a producir estructuras reproductivas, método conocido como “scozzolatura”, Nerd y Mizrahi, 1995; Reyes-Agüero *et al.*, 2006). En particular, *O. tomentosa* presentó una floración tardía en comparación a las demás especies de Opuntioideae. Murali y Sukumar (1994) encontraron en un bosque seco tropical que especies de menor incidencia tendían a florecer antes, durante la temporada seca, y concluyen que esto podría ser una adaptación para evitar el riesgo a la transferencia de polen heterospecífico o a la competencia por polinizadores.

Algo similar ocurre con dos especies simpátricas del género *Narcissus*, pues existe un desplazamiento temporal en la floración de ambas y esto, junto con otros factores, posiblemente limita la deposición de polen heterospecífico (Marques *et al.*, 2007). Por lo que este desplazamiento puede ser una estrategia en contra de la incidencia de polen heterospecífico y al mismo tiempo para asegurar la visita de los polinizadores disponibles.

De acuerdo a la segunda tabla de contingencia, la presencia de alguno de los marcadores depende de la especie que florece, donde 90.94% de las flores con algún marcador pertenecen a *O. tomentosa*, sin embargo esto es efecto de la frecuencia, pues a pesar de la gran cantidad de flores de *O. tomentosa*, lo que es una consecuencia directa de la frecuencia, pues a pesar de la gran cantidad de flores de *O. tomentosa*, notamos que también los marcadores se encontraban en las flores abiertas de *O. streptacantha*, en la mitad de *O. cantabrigiensis* y en 20% de *O. robusta* (tabla 8). Esto refleja que los polinizadores no tienen una constancia sobre la planta focal, como la tiene *Megachile* sp. sobre *Narcissus* ssp. (Marques *et al.*, 2007) o la abeja solitaria *Ceratina flavipes* sobre especies de jardín en Japón (Kobayashi-Kidokoro e Higashi, 2010). La ausencia de constancia aumenta la posibilidad del flujo de polen interespecífico, que no sólo resulta ser una pérdida de PC (polen conespecífico; Waser, 1978; Morales y Traveset, 2008), sino también a la posible transferencia de PH (polen heterospecífico), que en especies cercanas sin barreras reproductivas se puede traducir a hibridación (Brown y Mitchell, 2001; Morales y Traveset, 2008).

Se ha reportado que los miembros del género *Opuntia* llegan a presentar hibridación (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001). Los híbridos de *Opuntia* tienen características morfológicas intermedias entre sus progenitores, pueden ser fértiles e incluso son capaces de cruzarse con alguno de sus progenitores (Pinkava *et al.*, 1985); sin embargo esto no se debe tomar como una generalidad, pues se ha reportado que especies de este género también han presentado marcada separación genética entre

sus poblaciones (Muñoz-Urías, *et al.*, 2008). La hibridación también es considerada como una interferencia reproductiva (Nishida *et al.*, 2014), pues el producto resulta tener, en comparación de los progenitores, baja viabilidad, fertilidad y se sacrifica la producción de prole más fértil (Takakura, 2012). Por lo anterior, no podemos descartar la posibilidad de hibridación, sobre todo con *O. streptacantha* y *O. robusta*, pues son las especies que recibieron mayor cantidad de PH, medido por la presencia de polen de *O. tomentosa* marcado con colorante y polvos fluorescentes. El compartir polinizadores ya se ha reportado (e.g., Levin y Anderson, 1970; Waser, 1978; Liao *et al.*, 2011; Muchhala y Thomson, 2012), sin embargo la transferencia de PH se ha sobrellevado con los cambios en la arquitectura floral (Weberling, 1992), con los mecanismos de incompatibilidad (Harder *et al.*, 1993; Li y Newbigin, 2002) o con el desplazamiento temporal. Asimismo no se puede descartar la existencia de polinizadores compartidos con *C. imbricata*, ya que se encontraron tres flores con polen marcado de las 24 que abrieron durante todo el muestreo, esto se puede deber a que las flores de *O. tomentosa* y *C. imbricata* difieren tanto en color como en tamaño (Fig. 6), como sucede en *Stelis hymenantha* y *S. immersa*, que debido a su morfología floral y a la diferencia en tamaños, presentaron visita de polinizadores distintos (Albores-Ortiz y Sosa, 2006).

### 6.2.2 Distribución angular de las flores

No hubo dirección angular con mayor frecuencia en las flores con marcador, por lo que se puede inferir que la dirección angular de las flores no es un factor determinante en el forrajeo de los visitantes; esto es similar a lo encontrado por Ciar y colaboradores (2013) en el forrajeo de la especie *Tetragonula biroii*, pues observaron que no existe una preferencia de estas abejas sobre el ángulo en el que se encuentren los recursos y que el forrajeo es más bien dirigido por las condiciones ambientales como la velocidad y dirección del viento y por los sitios donde hay una mayor



cantidad de recursos, que se puede traducir a una mayor cantidad de flores; una alta densidad de flores aumenta el atractivo hacia los polinizadores, ya que frecuentemente está asociado a tasas altas de recompensas y reduce el tiempo de “viaje” (Grindeland *et al.*, 2005; Nattero *et al.*, 2011; Essenberg, 2012).

La medición en la que coinciden todas las especies es en la distribución de los individuos que no presentaba ningún marcador, es decir, las plantas que no atraían a visitantes de la planta focal. El rango por el que estaban estos individuos era de 181° hasta 225°, una posición Sur suroeste. Según el archivo meteorológico de Cadereyta de Montes los vientos se originan desde la posición Noreste hacia una posición Suroeste. Esa corriente de aire pudo haber afectado la preferencia de forrajeo de los visitantes, o dicho de otro modo, una corriente directa afectaría el vuelo de abejas y por tanto evitarán la interacción con esa corriente y así no llegarían a las plantas que se encuentren en la posición a la que va el viento (Thorp y Robin, 1996). Esta corriente de aire también pudo tener influencia sobre la deposición de los marcadores en las pocas plantas con flores marcadas en Sur suroeste (Fig. 13), Gaudeul y Till-Bottraud (2004) probaron la dispersión de polvos fluorescentes vía viento y vía polinizadores y encontraron que el viaje del polvo dado exclusivamente por el viento llega a ser menor de 10 m, pero que esta dispersión no tenía gran impacto en la reproducción en comparación a la dispersión por polinizadores, lo que nos dice que el movimiento de los polvos fluorescentes hacia la posición Sur suroeste es mayormente debido al viento que a los polinizadores.

### 6.2.3 Distancia del flujo

En este estudio no se presentó un efecto del tipo de marcador que se usó en las distancias alcanzadas por el polen, ni de la interacción entre el tipo de marcador y

la especie, contrario a lo reportado por Thomson y colaboradores (1986), donde el polvo fluorescente tiene una dispersión mayor respecto al flujo real de polen; o lo reportado por Campbell y colaboradores (1991), quienes compararon la exportación de polen real con la exportación de polvos y encontraron que existe una subestimación del marcador; estos resultados nos dice que los polvos fluorescentes es un buen método de marcaje, ya que estimaron el flujo real de la especie focal en el sitio evaluado, sin embargo, debemos considerar que el viento afectó la distribución obtenida por los polvos fluorescentes, lo que dice que la ausencia de viento es preferible para la evaluación de flujo.

Respecto al flujo, se encontró que hay efecto de la especie sobre el movimiento del polen pero esto se debe a que las flores presentes en el estudio en su mayoría pertenecieron a *O. tomentosa*. En un estudio hecho por Cabrera (2011) se evaluó la proporción de polen que llega a las plantas de *O. microdasys* según la distancia a la focal y se encontró que la deposición de polen es indirectamente proporcional a la distancia de las plantas receptoras, pues la mayor cantidad de polen de *Opuntia microdasys* se desplaza a distancias cercanas a la planta focal (<22 m), favoreciendo la geitonogamia y haya mayor número de autocruzas. Las plantas con presencia del polen marcado de *O. tomentosa* se encuentran en promedio a 22.44 m, pero se alcanzaron distancias mayores a esta (30.25 m, por lo menos una vez en cada vecindario); la visita de flores a distancia cortas se adjudica a la conducta frecuente de varios visitantes florales, que tienen la tendencia de visitar flores cercanas o de una misma planta (Ciar *et al.*, 2013), incrementando la autogamia y la geitonogamia (Harder y Barret, 1996), la visita de polinizadores en las mayores distancias mayores posiblemente se deba a la baja disponibilidad de flores a distancias más cortas (Albrecht *et al.*, 2009). En las especies que son autoincompatibles o que tienen altos niveles de depresión endogámica, la autogamia y la geitonogamia abaten considerablemente la producción de frutos y semillas, como es el caso de *Opuntia*

*microdasys* (Carrillo-Ángeles *et al.*, 2011), pero en especies como *O. tomentosa* que hay autocompatibilidad, esta puede ser una estrategia para asegurar la producción de semillas. Richards (1986) menciona que una ventaja de los sistemas de cruce mixtos es que una parte de la progenie tiene mayor variabilidad genética por recombinación en la alogamia y otra parte mediante la autogamia mantiene y dispersa el genotipo probado en el ambiente.

#### 6.2.4 Correlaciones

Los resultados indican que la presencia de ambos marcadores está directamente relacionada con el número de plantas reproductivas y en consecuencia con el número de flores presentes; esto tienen que ver con el atractivo de las zonas de alta densidad floral y la cantidad de recompensas disponibles para los polinizadores, pues se ha encontrado que a mayor cantidad de flores, mayor es la tasa de visitas de polinizadores, como lo observado en *Digitalis purpurea* (Grindland *et al.*, 2005) y en *Nierembergia linariifolia* (Nattero *et al.*, 2011), este tipo de comportamiento en los polinizadores se lo atribuye a que arreglos densos optimizan la obtención de recursos y reduce el tiempo de colecta (Esseberg, 2012).

Se encontró una relación negativa entre el número de flores con marcador de *O. tomentosa* y el número de flores de *O. streptacantha*; lo que puede interpretarse como una interferencia reproductiva, ya que la presencia de flores de *O. streptacantha* disminuye la deposición de PC sobre las flores de la especie focal y aumenta la posibilidad de que *O. tomentosa* reciba PH; derivándose en una posible disminución del éxito reproductivo de *O. tomentosa*, ya sea por una disminución de semillas producidas, como sucede *Hieracium floribundum* (Thomson y Andrews, 1981) o, por ser especies cercanas, produciendo semillas híbridas que pueden ser abortadas

(Harder *et al.*, 1993) o que pudieran competir con las semillas de *O. tomentosa*, como sucede en dos especies de *Lythrum* (Brown y Mitchell, 2001). Es posible que la población de la especie focal reduzca los efectos perjudiciales con la separación de su pico de floración del pico de las otras especies de Opuntioideae con las que coexiste en el sitio de estudio. Además, la interferencia reproductiva y el descuento de polen podría ser una de las razones que explican la producción tan alta de granos de polen pues, como menciona Waser (1978), sólo una pequeña fracción de todo el polen está involucrada con la fecundación en los sistemas reales, debido a la pérdida en su transporte entre flores y que gran proporción del polen es ofrecida como recompensa a sus polinizadores; por ejemplo, sólo el 4% de todo el polen fue tanto viable como depositado con éxito en un estigma, en experimentos de polinización de *Phlox glabberima* con mariposas (Levin y Berube, 1972).

## 7. Conclusiones

- Los dos marcadores del polen permitieron evaluar y de forma equivalente que la mayor distancia de deposición del polen de *Opuntia tomentosa* es a corta distancia (< 25 m). Por ello, el radio de 30 m utilizado como distancia para delimitar el área del flujo de polen de *O. tomentosa* es adecuado.
- El polen teñido con colorantes vegetales redujo el *seed set* de la especie focal, por lo que en especies en riesgo, que formen pocas semillas es una desventaja que debe considerarse. .
- Existe evidencia de movimiento de polvo fluorescente, y no del polen, en la dirección que sopla el viento, y puede constituir una sobreestimación del flujo de polen que requiere animales para su dispersión.
- La separación temporal en la floración de *Opuntia tomentosa* favorece la deposición de polen conoespecífico.
- No hay diferencias en las estimaciones de ambos marcadores

- La presencia simultanea de flores de otras especies de Opuntioidea propicia la deposición de polen marcado de manera heteroespecífica.
- La deposición de polen heterospecífico sugiere que en ausencia de barreras reproductivas, la hibridación es probable.
- Sólo se encontró polen marcado con polvo fluorescente sobre tres flores de *C. imbricata*, lo que indica que posiblemente comparte algunos polinizadores con *O. tomentosa*, pero la frecuencia es muy baja.
- La deposición de polen sugiere que el movimiento de los polinizadores es influido por la cantidad de flores y no por el ángulo ni la distancia en la que se encuentran en los vecindarios reproductivos.

## Literatura citada

- Ackerman J. 1999. Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. En: Dafni A, Hesse M y E Pacini (Eds.). Pollen and pollination. *Springer*. EUA. pp: 167-186.
- Adler L y R Irwin. 2006. Comparison of Pollen Transfer Dynamics by Multiple Floral Visitors with Pollen and Fluorescent Dye. *Annals of Botany*. 97:141-150.
- Albores-Ortiz O y V Sosa. 2006. Polinización de dos especies simpátricas de *Stelis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta Botánica Mexicana*. 74: 155-168.
- Alvarado Vázquez, M. 2003. Análisis fenológico y algunos aspectos reproductivos en especies selectas del matorral xerófilo del Noreste. Tesis para doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 131 p.
- Anderson E. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Oregon, EUA. 776 p.
- Ayala I. 2014. Ecología y dinámica del banco de semillas aéreo de *Cylindropuntia imbricata* (Cactaceae): Banco artificial creado de poblaciones del desierto Chihuahuense. Tesis para Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. México. 41 p.

- Batschelet E. 1981. *Circular Statistics in Biology*. Academic Press. Inglaterra. 371 p.
- Baker H. 1947. *Melandrium dioicum* (L. emend.) Coss. & Germ. *Journal of Ecology*. 35: 283-292.
- Barret S. 2002. The Evolution of Plant Sexual Diversity. *Nature reviews*. 3:274-284.
- Barret S. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. *Philosophical transactions of the Royal Society*. 358: 991-1004.
- Barret C y J Hough. 2013. Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*. 64: 67-82.
- Belmonte J, Pérez-Obiol R y J Roure. 1986. Claves para la determinación de los pólenes de las principales especies melíferas de la Península Ibérica. *Orsis*. 2: 27-54.
- Beutel C. 1971. Polinización en *Opuntia tomentosa* Salm-Dyck y *O. robusta* Wendland en el Pedregal de San Ángel. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 16: 84-86.
- Blair A y P Williamson. 2010. Pollen dispersal in star cactus (*Astrophytum asterias*). *Journal of Arid Environments*. 74: 535-537.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 745 p.
- Brown B y R Mitchell. 2001. Competition for pollination: effects of pollen of an invasive plant on seed set of a native congener. *Oecologia*. 129: 43-49.
- Cabrera, V. 2011. Características espaciales que afectan la distancia de dispersión de polen de *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 63 p.
- Campbell D, Waser N, Price M, Lynch E y R Mitchell. 1991. Components of phenotypic selection: Pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Society for the study of Evolution*. 6:1458-1467.
- Carrillo-Ángeles, I., Golubov, J., Milligan, B. y Mandujano, M. 2011. Spatial distribution pattern of a clonal species: effects of differential production of clonal and sexual offspring. *Evolution Ecology*. 25: 1357-1383.
- Chittka L, Thomson J y N Waser. 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften*. 86: 361-377.
- Ciar R, Bonto L, Bayer M, Rabajante J, Lubag S, Fajardo A y C Cervancia. 2013.

- Foraging behavior of stingless bees (*Tetragonula biroi* Friese): Distance, Direction and height of preferred food resource. Disponible en: ResearchGate.
- Cheptou P. 2012. The Evolution of Plant Mating System: Is It Time for a Synthesis? En: Fusté C. (Ed.). Studies in Population Genetics. Intech. EUA. pp: 17-38.
- Cox P. 1988. Monomorphic and Dimorphic Sexual Strategies: A modular approach. En: Lovett L (Ed.). Plant Reproductive Ecology. Oxford University Press. EUA. pp: 80-97.
- Crawley M. 1993. GLIM for Ecologist. Oxford University Press. 379 p.
- Culley T, Weller S y A Sakai. 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution*. 17: 361-369.
- Dafni A. 1992. Pollination Ecology: A practical Approach. Oxford University Press. Nueva York, EUA. 250 p.
- Dafni A y D Firmage. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*. 222: 113-132.
- Del Castillo R y M González-Espinosa. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia*. 71: 185-196.
- Domínguez C y J Pérez. 2013. La biología de la polinización. En: Márquez-Guzmán J, Collazo-Ortega M, Martínez M, Orozco A y Vázquez S (Eds.). Biología de Angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp: 78-109.
- Donoso C, Premoli A, Gallo L y R Ipinza. 2004. Variación Intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria. Chile. pp: 49-50.
- Dufay M, Champelovier P, Käfer J, Henry J, Mousset S y G Marais. 2014. An angiosperm-wide analysis of the gynodioecy-dioecy pathway. *Annals of Botany*. 114: 539-548.
- Essenberg C. 2012. Explaining Variation in the Effect of Floral Density on Pollinator Visitation. *The American Naturalist*. 180: 153-166.
- Everitt B. S. 1977. The analysis of contingency tables. Monographs on Statistics and applied probability. Chpman and Hall 128pp.
- Faegri K y L van der Pijl. 1979. The Principles of Pollination Ecology. Pergamon Press. EUA. 225 p.

- Fenster C, Armbruster S, Wilson P, Dudash M y J Thomson. 2004. Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*. 35:375-403.
- Fleming T. 2001. Sonoran Desert Columnar Cacti and the Evolution of Generalized Pollination Systems. *Ecological monographs*. 71: 511-530.
- Flores-Martínez A, Manzanero G, Golubov J y M Mandujano. 2013. Biología floral de *Mammillaria Huitzilopochtli*, una especie rara que habita acantilados. *Botanical Science*. 91: 349-356.
- Galicia Pérez A. 2013. Estudios sobre los sistemas de autoincompatibilidad presentes en *Opuntia tomentosa* SalmDyck (Cactaceae). Tesis para maestra en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 94 p.
- García S. 1984. Patrones de polinización y fenología floral en poblaciones de *Opuntia* spp. en San Luis Potosí y Zacatecas. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 128 p.
- García E, 2004. Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional de México, México.
- Garralla S y G Cuadrado. 2007. Pollen morphology of *Austrocylindropuntia* Backeb, *Maihueniopsis* Speg., *Opuntia* Mill and *Tephrocactus* Lem (Cactaceae, Opuntioideae) of Argentina. *Review of Paleobotany and Palynology*.146:1-17.
- Gaudeul M y Till-Bottraud. 2004. Reproductive ecology of de endangered Alpine species *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): Phenology, Gene Dispersal and Reproductive Succes. *Annals of Botany*. 93:711-721.
- Gibson A y P Nobel. 1986. The Cactus Primer. Harvard University Press. Boston, EUA. 286p.
- González A, Riojas M y H Arreola. 2001. El género *Opuntia* en Jalisco: Guía de campo. Universidad de Guadalajara. México. pp: 51-67.
- Gotelli M, Scambato A, Galati B y R Kiesling. 2009. Pollen development and morphology in four species of Pterocactus (Cactaceae). *Annales Boranoci Fannici*. 5: 409-415.
- Grant V, Grant A y P Hurd. 1979. Pollination of *Opuntia lindheimeri* and Related Species. *Plant Systematics and Evolution*. 132: 313-320.
- Grant V y P Hurd. 1979. Pollination of the southwestern opuntias. *Plant Systematics*



- and Evolution*. 133: 15-28.
- Grindeland J, Sletvold N e Ims A. 2005. Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. *Functional Ecology*. 19: 383-390.
- Guzmán U, Arias S y P Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. CONABIO. México. pp: 175, 195.
- Harder L, Cruzan M y B Thomson. 1993. Unilateral incompatibility and the effects of interspecific pollination for *Erythronium americanum* and *Erythronium albidum* (Liliaceae). *Canadian Journal of Botany*. 71: 353-358.
- Harder L y S Barrett. 1996. Pollen Dispersal and Mating Patterns in Animal-Pollinated Plants. En: Lloyd D y Barret S. (Eds). *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants*. Chapman & Hall. pp: 140-190.
- Harder L. 2000. Pollen dispersal and the floral diversity of Monocotyledins. En: Wilson K y D Morrison (Eds.). *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO. Australia pp: 243-257.
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y y K Shivanna. 1984. The evaluation of pollen quality and further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics*. 67: 367-375.
- Huerta M. 1995. Algunos aspectos de la polinización de *Opuntia streptacantha* Lemaire. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*.40: 68-72.
- Jardín Botánico Regional de Cadereyta “Ing. Manuel González Cosío”. En: <http://www.concyteq.edu.mx/> Revisado: Marzo 2014.
- Johnson D y T Edwards. 1999. The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution*. 222: 243-269.
- Kay Q. 1987. The comparative ecology of flowering. *New phytologist*. 106:256-281.
- Kearns C y D Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado.EUA. pp: 133-151.
- Kobayashi-Kidokoro M y S Higashi. 2010. Flower Constancy in the Generalist Pollinator *Ceratina flavipes*. (Hymenoptera: Apidae): An evaluation by Pollen analysis. *Psyche*.
- Koch E, Bruns E, Chmielewski F, Defila C, Lipa W y Menzel A. 2015. Guidelines for

plant phenological observations.

- Kuss P, Ægisdóttir H y J Stöcklin. 2003. The biological flora of Central Europe: *Campanula thyrsoides* L. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 9: 37-51.
- Lacey E. 1996. Parental effects in *Plantago lanceolata* L. I.: a growth chamber experiment to examine pre- and postzygotic temperature effects. *Evolution*. 50: 865-878.
- Lemaitre A, Pinto C y H Niemeyer. 2014. Generalized pollination system: Are floral traits adapted to different pollinators. *Arthropod-Plant Interactions*. 8: 261-272.
- Levin D y W Anderson. 1970. Competition for pollination between simultaneously flowering species. *American Naturalist*. 104:455-467.
- Levin D y D Berube. 1972. *Phlox* y *Colias*: the efficiency of a pollination system. *Evolution*. 26: 242-250.
- Li J y E Newbigin. 2002. Self-incompatibility in flowering plants: the ribonuclease-based systems. En: O'Neill S y Roberts J (Eds.). *Annual Plant Reviews: Plant Reproduction*. Sheffield. EUA. pp: 257-278.
- Liao K, Gituru R, You-Hao G y Q Wang. 2011. The presence of co-flowering species facilitates reproductive success of *Pedicularis monbeigiana* (Orobanchaceae) through variation in bumble-bee foraging behavior. *Annals of Botany*. 108: 877-884.
- López L, Márquez-Guzmán J y G Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 178 p.
- Lovett J y L Lovett. 1988. Sociobiology of Plants: An Emerging Synthesis. En: Lovett L (Ed.). *Plant Reproductive Ecology*. Oxford University Press. EUA. pp: 5-29.
- Ludlow, B. 2013. El androceo. En: Márquez-Guzmán J, Collazo-Ortega M, Martínez M, Orozco A y Vázquez S (Eds.). *Biología de Angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp: 60-67.
- Mahan R. 1991. Applications in Spatial and Temporal Performance Analysis. University of Georgia Press. EUA. 42 p.
- Mandujano M, Montaña C y L Eguiarte. 1996. Reproductive Ecology and Inbreeding Depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in Chihuahuan Desert; Why are sexually derived recruitments so rare? *American Journal of Botany*. 83: 63-70.

- Mandujano M, Carillo-Ángeles I, Martínez-Peralta C y J Golubov. 2010. Reproductive Biology of Cactaceae. En: Ramawat K (Ed.). Desert plants. Sukhadia University. pp: 197-230.
- Mandujano M, Plasencia-López L, Aguilar-Morales G, Jiménez-Guzmán G, Galicia-Pérez A, Rojas-Aréchiga M y C Martínez Peralta. 2014. Sistema sexual de *Opuntia tomentosa* Salm-Dyck (Cactaceae, Opuntioideae) en un pedregal de origen volcánico. *Cactáceas y Suculentas mexicanas*. 59: 100-120.
- Martínez-Gordillo M. 2013. Las angiospermas: innovadoras del reino Plantae. En: Márquez-Guzmán J, Collazo-Ortega M, Martínez M, Orozco A y Vázquez-Santana S (Eds). Biología de Angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 10-19.
- Martínez-Peralta C y M Mandujano. 2011. Reproductive ecology of the endangered living rock cactus, *Ariocarpus fissuratus* (Cactaceae). *Journal of the Torrey Botanical Society*. 138: 145-155.
- Marques I, Rossello-Graell A, Draper D y J Iriondo. 2007. Pollination patterns limit hybridization between two sympatric species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*. 94: 1352-1359.
- McDonald C y G McPherson. 2005. Pollination of Pima Pineapple Cactus (*Coryphanthasheeri* var. *robustispina*): Does Pollen Flow Limit Abundance of This Endangered Species? En: USDA Forest Service Proceeding RMRS. pp: 529-532.
- Medina R. 2012. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 235 p.
- Muchhala N y J Thomson. 2012. Interspecific competition in pollination systems: costs to male fitness via pollen misplacement. *Functional Ecology*. 26: 476-482.
- Müller, H. 1881. Alpenblumen, ihre befruchtung durch insekten und ihre anpassungen an dieselben. Citado en: Knuth, P. 1906. A Handbook of Flower Pollination. Oxford. Inglaterra. 382 p.
- Muñoz-Urías A, Palomino-Hasbach G, Terrazas T, García-Velázquez A y E Pimienta. 2008. Variación anatómica y morfológica en especies y entre poblaciones de *Opuntia* en la porción sur del Desierto Chihuahuense. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 83: 1-11.
- Murali K y R Sukumar. 1994. Phenology of a tropical dry forest in Mudumalai,

- Southern India. *Journal of Ecology*. 82: 759-767.
- Nassar J y N Ramírez. 2004. Reproductive biology of the melon cactus, *Melocactus cuvispinus* (Cactaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 248: 31-44.
- Nattero J, Malerba R, Medel R y A Cocucci. 2011. Factors affecting pollinator movement and plant fitness in a specialized pollination system. *Plant Systematics and Evolution*. 296: 77-85.
- Nerd A y Y Mizrahi. 1995. Reproductive biology. En: Barbera G, Inglese P y E Pimienta-Barrios (eds.). *Plant production and protection*. pp: 49-57.
- Nishida S, Kanaoka M, Hashimoto K, Takakura K y T Nishida. 2014. Pollen-pistil interactions in reproductive interference comoparisons of heterospecific pollen tube growth from alien species between two native *Tarazacum* species. *Functional Ecology*. 28: 450-457.
- Orozco-Arroyo G y S Vázquez-Santana. 2013. Sistemas de Reproducción. En: Márquez-Guzmán J, Collazo-Ortega M, Martínez M, Orozco A y Vázquez-Santana S (Eds). *Biología de Angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 158-168.
- Pimienta E y R del Castillo. 2002. Reproductive biology. En: Nobel Ps (Ed). *Cacti: biology and uses*. University of California Press. Berkeley. pp: 75-90.
- Pinkava D, Baker M, Parfitt B y M Mohlenbrock. 1985. Chromosome Numbers in some Cacti of Western North America. *Systematic Botany*. 10:471-483.
- Rathcke B. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. En Real L (Ed.) *Pollination Biology*. Academic Press. Londres. pp: 305-329.
- Raven P y R Evert. 1981. *Biology of plants*. Worth Publishers. EUA. 686 p.
- Rejón J, Suárez C, Alché J, Castro A y M Rodríguez-García. 2010 Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de Olivo (*Olea europea* L.). *Polen*. Universidad de Salamanca, 20: 61-72.
- Renner S y R Ricklesfs. 199. Dioecy and its correlates in flowering plants. *American Journal of Botany*. 14: 244-254.
- Reyes-Santiago J. 2011. Conservación y restauración de cactáceas y otras plantas suculentas mexicanas: Manual práctico. SEMARNAT. México. 108 p.
- Reyes-Agüero J, Aguirre J y A Valiente-Banuet. 2006. Reproductive biology of

- Opuntia: a review. *Arid Environmental*. 64: 549-585.
- Richards J, 1986. Plant Breeding Systems. Chapman & Hall. Londres RU. 535 p.
- Rosas C y E Pimienta. 1986. Polinización y fase progámica en nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). *Tunero Fitotecnia*. 8: 164-176.
- Ross R. 1981. Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. *American Journal of Botany*. 68: 463-470.
- Sánchez E, Hernández M, Maruri B, Hernández J y F Hernández. 2012. Acciones y respuestas del Jardín Botánico de Cadereyta ante la Estrategia Global para la Conservación Vegetal. En: Caballero J (Coord). Jardines Botánicos contribución a la conservación vegetal de México. CONABIO.México. pp: 43-53.
- Scheepens J, Frei E, Armbruster G y J Stocklin. 2012. Pollen dispersal and gene flow within and into a population of the alpine monocarpic plant *Campanula thyrsoides*. *Annals of Botany*. 110: 1479-1488.
- Shivanna K y B Johri. 1985. The Angiosperm Pollen: Structure and function. Wiley Eastern.EUA. pp: 90-91.
- Shivanna K. 2003. Pollen Biology and Biotechnology.Science. Publishers.Enfielld, EUA. 301 p.
- Shivanna K y R Tandon. 2014. Reproductive ecology of flowering plants: A manual. Springer. EUA. 169 p.
- SMN. 2010. Normales climatológicas 1981-2010. Estado de Querétaro. Estación Cadereyta. Servicio Nacional Meteorológico. En: <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/Normales7100/NORMAL22021.TXT>  
Revisado: Marzo, 2015.
- Snow A y P Lewis. 1993. Reproductive traits and male fertility in plants: Empirical Approaches. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24: 331-351.
- Stern K, Bidlack J y S Jansky. 2008. Introductory Plant Biology. McGraw Hill. México. 542 p.
- Stebbins L. 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia Biological Series. EUA. 643 p.
- Takakura K. 2012. No Reproductive Interference from an Alien to a Native Species in *Cerastium* (Caryophyllaceae) at the Stage of seed production. *ISRN Botany*.

- Thomson J. 1981. Spatial and Temporal Components of Resource Assessment by Flower-Feeding insects. *Journal of Animal Ecology*. 50:49-59.
- Thomson J y B Andrews. 1982. The effect a foreign pollen on ovules development in *Diervilla lonicera* (Caprifoliaceae). *The New Phytologist*. 90: 777-783.
- Thomson J, Price M, Waser N y D Stratton. 1986. Comparative studies of pollen and fluorescent dye transport by bumble bees visiting *Erythronium grandiflorum*. *Oecologia*. 69: 561-566.
- Van-Rossum F, Stiers I, Van-Geert A, Triest L y J Oliver. 2009. Fluorescent dye particles as pollen analogues for measuring pollen dispersal in an insect-pollinated forest herb. *Oecologia*. 161: 663-674.
- Waser N. 1978. Interspecific pollen transfer and competition between Co-occurring plant species. *Oecologia*. 36: 223-236.
- Waser N y M Price. 1982. A comparison of pollen and fluorescent dye carryover by natural pollinator of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *Ecology*. 63: 1168-1172.
- Waser N. 1986. Flower constancy: definition, cause and measurement. *American Naturalist*. 127: 596-603.
- Waser N y M Fugate. 1986. Pollen precedence and stigma closure: a mechanism of competition for pollination between *Delphinium nelsonii* and *Ipomopsis aggregata*. *Oecologia*. 70: 573-577.
- Weberling F. 1992. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press. Inglaterra. pp: 317-320.
- Williams G y P Adam. 2010. The Flowering of Australia's Rainforests: A plant and Pollination Miscellany. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. pp: 69-73.
- Zar J. 2010. Biostatistical analysis. Prentice Hall. EUA. 944 p.

## Anexo 1.

Lactofenol con azul de anilina. Técnica para determinar la viabilidad de polen (tomada y modificada de López *et al.*, 2005)

## Reactivos:

Agua destilada	20 mL
Ácido láctico (85% o mayor)	20 mL
Cristales de fenol	20 g
Azul de anilina (soluble en agua)	0.05 g
Glicerol	40 mL

## Procedimiento

Para la preparación. Disolver los cristales de fenol en el ácido láctico, añadir el glicerol y el agua; siempre agitar suavemente. Finalmente se añade el azul de analina. Este colorante debe ser evaluado constantemente ya que pierde su efectividad con el tiempo; se recomienda prepararlo diariamente o semanalmente. Mantener en oscuridad, a temperatura ambiente. Por su toxicidad, se recomienda neutralizarlo con hipoclorito de sodio antes de desecharlo.

## Anexo 2

Prueba no paramétrica,  $\rho$  de Spearman.

<b>Variable</b>	<b>Por variable</b>	<b><math>\rho</math> de Spearman</b>	<b>Prob&gt;  <math>\rho</math> </b>
NrepCimb	NrepOcan	0.4643	0.0097
NrepOrob	NrepOcan	0.5372	0.0022
NrepOrob	NrepCimb	0.6581	<.0001
NrepOstre	NrepOcan	0.379	0.0389
NrepOstre	NrepCimb	0.2103	0.2647
NrepOstre	NrepOrob	0.1766	0.3504
NrepOtom	NrepOcan	0.2346	0.212
NrepOtom	NrepCimb	0.2213	0.24
NrepOtom	NrepOrob	0.1663	0.3798
NrepOtom	NrepOstre	-0.3048	0.1014
NpolvoOcan	NrepOcan	0.7492	<.0001

NpolvoOcan	NrepCimb	0.1887	0.3178
NpolvoOcan	NrepOrob	0.3652	0.0472
NpolvoOcan	NrepOstre	0.2636	0.1593
NpolvoOcan	NrepOtom	0.2512	0.1806
NpolvoCimb	NrepOcan	-	-
NpolvoCimb	NrepCimb	-	-
NpolvoCimb	NrepOrob	-	-
NpolvoCimb	NrepOstre	-	-
NpolvoCimb	NrepOtom	-	-
NpolvoCimb	NpolvoOcan	-	-
NpolvoOrob	NrepOcan	0.0865	0.6495
NpolvoOrob	NrepCimb	0.0708	0.7101
NpolvoOrob	NrepOrob	0.6303	0.0002
NpolvoOrob	NrepOstre	0.0612	0.748
NpolvoOrob	NrepOtom	0.1315	0.4886
NpolvoOrob	NpolvoOcan	0.2106	0.2641
NpolvoOrob	NpolvoCimb	-	-
NpolvoOstre	NrepOcan	0.3106	0.0948
NpolvoOstre	NrepCimb	0.3081	0.0977
NpolvoOstre	NrepOrob	0.2807	0.133
NpolvoOstre	NrepOstre	0.8392	<.0001
NpolvoOstre	NrepOtom	-0.2013	0.286
NpolvoOstre	NpolvoOcan	0.1097	0.564
NpolvoOstre	NpolvoCimb	-	-
NpolvoOstre	NpolvoOrob	0.129	0.497
NpolvoOtom	NrepOcan	-0.0978	0.6071
NpolvoOtom	NrepCimb	-0.0767	0.6871
NpolvoOtom	NrepOrob	0.0014	0.9943
NpolvoOtom	NrepOstre	-0.3793	0.0387
NpolvoOtom	NrepOtom	0.7872	<.0001
NpolvoOtom	NpolvoOcan	0.1847	0.3286
NpolvoOtom	NpolvoCimb	-	-
NpolvoOtom	NpolvoOrob	0.2519	0.1793
NpolvoOtom	NpolvoOstre	-0.3502	0.0578
NcolorOcan	NrepOcan	0.6211	0.0002
NcolorOcan	NrepCimb	0.4753	0.0079
NcolorOcan	NrepOrob	0.4528	0.012
NcolorOcan	NrepOstre	0.4568	0.0112
NcolorOcan	NrepOtom	0.1163	0.5404
NcolorOcan	NpolvoOcan	0.5043	0.0045



NcolorOcan	NpolvoCimb	-	-
NcolorOcan	NpolvoOrob	0.1137	0.5497
NcolorOcan	NpolvoOstre	0.5626	0.0012
NcolorOcan	NpolvoOtom	-0.0874	0.646
NcolorCimb	NrepOcan	0.2822	0.1308
NcolorCimb	NrepCimb	0.3741	0.0417
NcolorCimb	NrepOrob	0.2332	0.2149
NcolorCimb	NrepOstre	0.5264	0.0028
NcolorCimb	NrepOtom	-0.2293	0.2229
NcolorCimb	NpolvoOcan	-0.102	0.5917
NcolorCimb	NpolvoCimb	-	-
NcolorCimb	NpolvoOrob	-0.083	0.6626
NcolorCimb	NpolvoOstre	0.5974	0.0005
NcolorCimb	NpolvoOtom	-0.2724	0.1453
NcolorCimb	NcolorOcan	0.4902	0.006
NcolorOrob	NrepOcan	0.183	0.3331
NcolorOrob	NrepCimb	-0.0366	0.8477
NcolorOrob	NrepOrob	0.5743	0.0009
NcolorOrob	NrepOstre	0.1311	0.49
NcolorOrob	NrepOtom	0.1115	0.5576
NcolorOrob	NpolvoOcan	0.3044	0.102
NcolorOrob	NpolvoCimb	-	-
NcolorOrob	NpolvoOrob	0.8754	<.0001
NcolorOrob	NpolvoOstre	0.2041	0.2793
NcolorOrob	NpolvoOtom	0.1514	0.4244
NcolorOrob	NcolorOcan	0.1943	0.3037
NcolorOrob	NcolorCimb	-0.0727	0.7026
NcolorOstre	NrepOcan	0.1205	0.5258
NcolorOstre	NrepCimb	0.1944	0.3033
NcolorOstre	NrepOrob	0.0832	0.6619
NcolorOstre	NrepOstre	0.7067	<.0001
NcolorOstre	NrepOtom	-0.3906	0.0329
NcolorOstre	NpolvoOcan	-0.1467	0.4391
NcolorOstre	NpolvoCimb	-	-
NcolorOstre	NpolvoOrob	-0.1195	0.5295
NcolorOstre	NpolvoOstre	0.8306	<.0001
NcolorOstre	NpolvoOtom	-0.4222	0.0201
NcolorOstre	NcolorOcan	0.3138	0.0912
NcolorOstre	NcolorCimb	0.7192	<.0001
NcolorOstre	NcolorOrob	-0.1046	0.5824

NcolorOtom	NrepOcan	-0.149	0.4321
NcolorOtom	NrepCimb	0.026	0.8916
NcolorOtom	NrepOrob	-0.0503	0.792
NcolorOtom	NrepOstre	-0.5025	0.0047
NcolorOtom	NrepOtom	0.6456	0.0001
NcolorOtom	NpolvoOcan	0.0225	0.906
NcolorOtom	NpolvoCimb	-	-
NcolorOtom	NpolvoOrob	0.0419	0.826
NcolorOtom	NpolvoOstre	-0.3975	0.0296
NcolorOtom	NpolvoOtom	0.7988	<.0001
NcolorOtom	NcolorOcan	-0.0653	0.7319
NcolorOtom	NcolorCimb	-0.2827	0.1301
NcolorOtom	NcolorOrob	-0.0449	0.8138
NcolorOtom	NcolorOstre	-0.4066	0.0257
fCimb	fOcan	0.4938	0.0056
fOrob	fOcan	0.5373	0.0022
fOrob	fCimb	0.7564	<.0001
fOstre	fOcan	0.3182	0.0866
fOstre	fCimb	0.2845	0.1276
fOstre	fOrob	0.3522	0.0563
fOtom	fOcan	-0.0444	0.816
fOtom	fCimb	0.2024	0.2835
fOtom	fOrob	0.0905	0.6342
fOtom	fOstre	-0.3089	0.0967
fOcanpolvo	fOcan	0.7664	<.0001
fOcanpolvo	fCimb	0.2228	0.2366
fOcanpolvo	fOrob	0.3419	0.0644
fOcanpolvo	fOstre	0.1091	0.566
fOcanpolvo	fOtom	-0.1973	0.2961
fCimbpolvo	fOcan	-	-
fCimbpolvo	fCimb	-	-
fCimbpolvo	fOrob	-	-
fCimbpolvo	fOstre	-	-
fCimbpolvo	fOtom	-	-
fCimbpolvo	fOcanpolvo	-	-
fOrobpolvo	fOcan	0.094	0.6213
fOrobpolvo	fCimb	0.1283	0.4991
fOrobpolvo	fOrob	0.6291	0.0002
fOrobpolvo	fOstre	0.1561	0.41
fOrobpolvo	fOtom	0.105	0.5808

fOrobpolvo	fOcanpolvo	0.2073	0.2718
fOrobpolvo	fCimbpolvo	-	-
fOstrepolvo	fOcan	0.3182	0.0866
fOstrepolvo	fCimb	0.2845	0.1276
fOstrepolvo	fOrob	0.3522	0.0563
fOstrepolvo	fOstre	1	<.0001
fOstrepolvo	fOtom	-0.3089	0.0967
fOstrepolvo	fOcanpolvo	0.1091	0.566
fOstrepolvo	fCimbpolvo	-	-
fOstrepolvo	fOrobpolvo	0.1561	0.41
fOtompolvo	fOcan	-0.2369	0.2075
fOtompolvo	fCimb	0.0043	0.982
fOtompolvo	fOrob	-0.0614	0.7473
fOtompolvo	fOstre	-0.4579	0.0109
fOtompolvo	fOtom	0.9162	<.0001
fOtompolvo	fOcanpolvo	-0.1604	0.3972
fOtompolvo	fCimbpolvo	-	-
fOtompolvo	fOrobpolvo	0.1205	0.5258
fOtompolvo	fOstrepolvo	-0.4579	0.0109
fOcancolor	fOcan	0.636	0.0002
fOcancolor	fCimb	0.4745	0.0081
fOcancolor	fOrob	0.5073	0.0042
fOcancolor	fOstre	0.5624	0.0012
fOcancolor	fOtom	-0.269	0.1506
fOcancolor	fOcanpolvo	0.5248	0.0029
fOcancolor	fCimbpolvo	-	-
fOcancolor	fOrobpolvo	0.1419	0.4543
fOcancolor	fOstrepolvo	0.5624	0.0012
fOcancolor	fOtompolvo	-0.4161	0.0222
fCimbcolor	fOcan	0.2945	0.1142
fCimbcolor	fCimb	0.3447	0.0621
fCimbcolor	fOrob	0.3471	0.0602
fCimbcolor	fOstre	0.5974	0.0005
fCimbcolor	fOtom	-0.1288	0.4977
fCimbcolor	fOcanpolvo	-0.1015	0.5936
fCimbcolor	fCimbpolvo	-	-
fCimbcolor	fOrobpolvo	-0.0827	0.6639
fCimbcolor	fOstrepolvo	0.5974	0.0005
fCimbcolor	fOtompolvo	-0.2899	0.1203
fCimbcolor	fOcancolor	0.4901	0.006

fOrobcolor	fOcan	0.1761	0.3518
fOrobcolor	fCimb	-0.0327	0.8638
fOrobcolor	fOrob	0.5305	0.0026
fOrobcolor	fOstre	0.2041	0.2793
fOrobcolor	fOtom	-0.0396	0.8355
fOrobcolor	fOcanpolvo	0.2881	0.1227
fOrobcolor	fCimbpolvo	-	-
fOrobcolor	fOrobpolvo	0.8501	<.0001
fOrobcolor	fOstrepolvo	0.2041	0.2793
fOrobcolor	fOtompolvo	-0.0323	0.8657
fOrobcolor	fOcancolor	0.1942	0.3038
fOrobcolor	fCimbcolor	-0.0727	0.7026
fOstrecolor	fOcan	0.1298	0.4941
fOstrecolor	fCimb	0.1795	0.3425
fOstrecolor	fOrob	0.1686	0.3732
fOstrecolor	fOstre	0.8306	<.0001
fOstrecolor	fOtom	-0.2971	0.1109
fOstrecolor	fOcanpolvo	-0.146	0.4415
fOstrecolor	fCimbpolvo	-	-
fOstrecolor	fOrobpolvo	-0.119	0.5312
fOstrecolor	fOstrepolvo	0.8306	<.0001
fOstrecolor	fOtompolvo	-0.3871	0.0346
fOstrecolor	fOcancolor	0.3137	0.0914
fOstrecolor	fCimbcolor	0.7192	<.0001
fOstrecolor	fOrobcolor	-0.1046	0.5824
fOtomcolor	fOcan	-0.4451	0.0137
fOtomcolor	fCimb	-0.0837	0.6602
fOtomcolor	fOrob	-0.205	0.2773
fOtomcolor	fOstre	-0.3812	0.0377
fOtomcolor	fOtom	0.6599	<.0001
fOtomcolor	fOcanpolvo	-0.3241	0.0806
fOtomcolor	fCimbpolvo	-	-
fOtomcolor	fOrobpolvo	0.0239	0.9004
fOtomcolor	fOstrepolvo	-0.3812	0.0377
fOtomcolor	fOtompolvo	0.7547	<.0001
fOtomcolor	fOcancolor	-0.3549	0.0543
fOtomcolor	fCimbcolor	-0.2468	0.1886
fOtomcolor	fOrobcolor	-0.1433	0.4501
fOtomcolor	fOstrecolor	-0.3326	0.0725