



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTOS DE LA ENDOGAMIA EN *Nicotiana glauca*, UNA ESPECIE**

**AUTOINCOMPATIBLE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. ESPINOSA SÁNCHEZ MAGALI YADIRA**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

**CIUDAD DE MÉXICO**

**ENERO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTOS DE LA ENDOGAMIA EN *Nicotiana glauca*, UNA ESPECIE**

**AUTOINCOMPATIBLE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. ESPINOSA SÁNCHEZ MAGALI YADIRA**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

**CIUDAD DE MÉXICO**

**ENERO, 2017**

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

OFICIO FCIE/DEP/013/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de octubre de 2016** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **ESPINOSA SÁNCHEZ MAGALI YADIRA** con número de cuenta **300205194** con la tesis titulada "**Efectos de la endogamia en *Nicotiana rastroensis*, una especie autoincompatible**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**:

Presidente: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN  
Vocal: DR. FRANCISCO ALBERTO RIVERA ORTÍZ  
Secretario: DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO  
Suplente: DRA. MARÍA FELIX RAMOS ORDOÑEZ  
Suplente: DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de enero de 2017

  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo durante el desarrollo y para la culminación de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

A los miembros del Comité Tutor: Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán y Dr. León Patricio Martínez Castilla por el apoyo, confianza e interés para la realización de esta tesis.

Este trabajo se realizó bajo la Dirección de la Dra. Sonia Vázquez Santana en el laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser el lugar que me ha permitido crecer profesional y personalmente.

Al Dr. Felipe Cruz García por compartir conmigo sus conocimientos y opiniones, por su asesoría, paciencia y por permitirme cuestionar y descubrir tantas cosas sobre *Nicotiana glauca*.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por años de enseñanza, amistad y convivencia. Gracias por haberme motivado en todo momento, por haber sido mi guía nuevamente, por todas las facilidades que me brindaste para realizar este trabajo y por ser un ejemplo a seguir.

A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán y al Dr. León Patricio Martínez Castilla por ser parte de mi Comité Tutor.

A los integrantes del jurado: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dr. Francisco Alberto Rivera Ortiz, Dra. Martha Juana Martínez Gordillo, Dra. María Félix Ramos Ordoñez y Dr. León Patricio Martínez Castillo, por su tiempo y dedicación para la revisión de la tesis y por sus valiosas sugerencias que me permitieron mejorar este trabajo.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías por el procesamiento y toma de fotografías en el Microscopio Electrónico de Barrido de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM, por su ayuda en la toma de microfotografías.

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

A la Dra. María Félix Ramos Ordoñez por su apoyo y asesoría para realizar el análisis estadístico. Por apoyarme y alentarme a finalizar este trabajo, sin ti no habría sido posible.

A los Profesores del Laboratorio de Desarrollo en Plantas: Judith Márquez, Margarita Collazo, Ricardo Wong, Mónica Pérez Pacheco y Karina Jiménez.

A los compañeros del Laboratorio de Desarrollo en Plantas: Aldebaran, Laurent †, María, Mónica y Saúl. Por la ayuda, la convivencia y el aprendizaje que me brindaron dentro y fuera del laboratorio.

Al laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis, en especial a la M. en C. Yuridia Cruz González, a la M. en C. Liliana García Valencia y al Dr. Felipe Cruz García.

A la M. en C. Elizabeth Chávez García, excompañera del laboratorio de Desarrollo en Plantas, quien es un ejemplo a seguir, por contribuir con sus sugerencias y correcciones en la etapa final de este trabajo.

A Viridiana Corona Plascencia, estudiante de la Licenciatura en Ciencia Forense, por su ayuda moral, emocional e intelectualmente. Por su ayuda con las imágenes que ilustran este trabajo y que le dan una mejor presentación.

Al Biól. Saúl Gómez Sánchez por ayudarme a cuidar decenas de plantas, coleccionar material, realizar las polinizaciones, transplantar, ah, y por no distraerme cuando contaba polen y óvulos. Gracias por tu apoyo constante e incondicional en el invernadero y laboratorio.



## DEDICATORIA

A mis padres Javier y Elisa por su amor, comprensión, sacrificios hechos y su apoyo incondicional. Gracias por estar conmigo y apoyarme en cada decisión. La vida no me alcanzará para terminar de agradecerles, los amo profundamente.

A mis hermanos Javier e Iván que son para mí un ejemplo en varios aspectos. Gracias por su paciencia, apoyo, cariño y consejos.

A mis sobrinos Andrea, Mateo, Yair y Valentina, cada uno tan distinto, que con sus sonrisas, travesuras y juegos me han llenado de tantas alegrías y sobre todo me han enseñado muchas cosas lindas y divertidas ¡Los amo mis niños!

A la Dra. María Felix Ramos por todo su tiempo, apoyo, cariño y amistad. Muchas gracias Dra. por siempre hacer un espacio para estar conmigo en el laboratorio, en un café o en tu casa y dedicar horas enseñándome y acompañándome para terminar este trabajo. Y hasta por las salidas de campo y las vacaciones. Te quiero mucho.

A mi asesora, la Dra. Sonia Vázquez, que además de ser una gran tutora también es una gran persona. Muchas gracias por tu confianza, dedicación y paciencia.

A mis amigos de siempre Daniel y Gustavo, con quienes he compartido distintas etapas. A Ariadna por estar aún en la distancia. A Monserrat por siempre tener una sonrisa. Cada momento con ustedes es muy especial. Gracias por echarme porras siempre.

A Brenda y Viridiana por su apoyo en todo, por las largas pláticas con café, cerveza, mezcal, hasta rompo. De todo corazón les agradezco su amistad, por contagiarme de sus ánimos y risas y por siempre estar ahí para escuchar mis quejas, desahogos y soportar mis cambios de humor. Las quiero.

A Saúl por estar en los altibajos de la vida académica y personal. Por ser mi compañero durante estos años, por incitarme a ser una mejor persona y dar lo mejor de mí. Gracias por apoyarme, entenderme y darme ese espacio para terminar este proyecto, pero sobre todo por soportar mi estrés y todos los estados de ánimo que aumentaban conforme este escrito avanzaba. Esta meta que ambos iniciamos ya la culmine, el próximo eres tú y te apoyare tanto como tú me apoyaste a mí. ¡Te amo Maléfico!

# ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Endogamia	5
II. ANTECEDENTES	6
2.1. Polinización y fecundación	6
2.2. Adaptaciones que previenen la depresión por endogamia	7
2.2.1. Sistemas de autoincompatibilidad (AI)	7
2.3. Sistema de AI en Solanaceae	10
2.4. Sistema de AI en <i>Nicotiana</i>	12
2.5. El caso de <i>Nicotiana rastroensis</i>	13
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1. Cruzas autógamas y obtención de las generaciones F <sub>1</sub> y F <sub>2</sub>	17
5.2. Análisis morfológico e histológico	18
5.3. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	18
5.4. Inclusión en LR-White	18
5.5. Inclusión en Paraplast	19
5.6. Producción de granos de polen	19
5.7. Viabilidad de granos de polen	19
5.8. Producción de óvulos	20
5.9. Viabilidad de semillas	20

5.10. Análisis de datos	20
5.11. Hercogamia	20
VI. RESULTADOS	
6.1. Desarrollo de las flores silvestres (WT)	21
6.2. Morfología floral de las plantas silvestres (WT)	24
6.3. Desarrollo floral de las generaciones F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> y la retrocruza	28
6.4. Alteraciones morfológicas florales en la generación F <sub>1</sub>	30
6.5. Alteraciones morfológicas florales en los individuos de la generación F <sub>1</sub>	37
6.6. Alteraciones morfológicas florales en los individuos producto de la retrocruza de WT x F <sub>1</sub>	39
6.7. Efectos de la endogamia en la fertilidad masculina	41
6.7.1. Cantidad de granos de polen por flor	41
6.7.2. Viabilidad de granos de polen	41
6.8. Efectos de la endogamia en la esterilidad femenina	44
6.8.1. Cantidad de óvulos por flor	44
6.8.2. Germinación de semillas	44
6.9. Hercogamia	44
6.10. Rasgos botánicos de la especie	49
VII. DISCUSIÓN	52
VIII. CONCLUSIÓN	63
IX. LITERATURA CITADA	64

## RESUMEN

El éxito reproductivo en las angiospermas se debe en gran parte a la evolución de varios mecanismos morfológicos, fisiológicos y genéticos que promueven la fecundación cruzada aumentando la variabilidad genética. Al aumentar los eventos de autofecundación, las poblaciones experimentan una depresión genética por endogamia, esto es, una reducción observada en el valor adaptativo de un carácter debido a la cruce de elementos genéticos estrechamente relacionados. Entre las adaptaciones que evitan la autofecundación, están la hercogamia, la dicogamia, la unisexualidad de los individuos y los sistemas de autoincompatibilidad. Sin embargo, cuando estas barreras se rompen y ocurre el entrecruzamiento entre individuos muy cercanos puede llevar a la expresión de características o alteraciones en la morfología y/o la viabilidad. *Nicotiana rastroensis* es una especie autoincompatible originaria de Serra Geral, al sur de Santa Catarina Brasil. En observaciones previas, se detectó que las plantas de *N. rastroensis* al ser autofecundadas, previo a la activación del sistema de incompatibilidad (dos días preantesis) forman semillas, pero la progenie, de la generación F<sub>1</sub>, al llegar a etapa reproductiva, muestra algunos individuos con malformaciones, que van desde una corola duplicada hasta una disminución en la producción de polen viable. A partir de estas observaciones, se planteó la pregunta ¿las plantas parentales pueden ser heterocigóticas para algunos factores involucrados en la reproducción de *N. rastroensis*?

El objetivo general de este trabajo fue describir el desarrollo floral de *N. rastroensis*, así como las características morfológicas y reproductivas de la flor, y analizar las alteraciones derivadas de la autocruza, en las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, así como en las retrocruzas del morfo silvestre por F<sub>1</sub>. Particularmente, (1) se describió el desarrollo floral de *N. rastroensis*; (2) se describieron las características morfológicas de la flor silvestre de *N. rastroensis*; (3) se caracterizó la fertilidad masculina y femenina de la flor silvestre de *N. rastroensis*, expresadas por la cantidad y viabilidad de los granos de polen, la cantidad de óvulos y porcentaje de germinación de semillas; (4) se describieron las alteraciones morfológicas, producto de las autopolinizaciones (geitonogamia), en las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, así como en retrocruzas de individuos silvestres (WT) y F<sub>1</sub> de *N.*

*rastroensis* y; (5) se determinaron los efectos en la fertilidad masculina y femenina en los individuos de las generaciones  $F_1$  y  $F_2$ , y retrocruzas de *N. rastroensis*.

Se encontró que el patrón de desarrollo de *N. rastroensis* es muy similar al descrito para otras especies de solanáceas; la morfología de la flor también es muy similar a las especies de la sección *Alatae*. La fertilidad masculina, en el morfo silvestre es buena, en promedio se producen 696 granos de polen con una viabilidad por arriba del 80%; la fertilidad femenina también presenta valores altos, con 334 óvulos producidos en promedio, con un porcentaje de germinación de semillas de 47%. Al realizar las autopolinizaciones, en los individuos de las generaciones  $F_1$  y  $F_2$ , así como la retrocruza se desarrolló una doble corola, en donde los pétalos presentan apéndices con características similares al mismo pétalo, además presentaron variaciones en la longitud de la corola, pistilo y estambres. La fertilidad masculina disminuye significativamente a medida que se pierde variabilidad genética del morfo silvestre, debida a las autopolinizaciones. La fertilidad femenina sólo disminuye en el porcentaje de germinación de semillas, mientras que la producción de óvulos no presenta cambios drásticos.

La autoincompatibilidad de *N. rastroensis* ocurre entre los órganos de la misma flor, pero no entre las flores del mismo individuo. El morfo silvestre es heterocigótico y se encuentra deprimido endogámicamente, esto queda demostrado por la rapidez en que se presentan las alteraciones, tanto morfológicas como reproductivas en la  $F_1$  y  $F_2$ . Las retrocruzas realizadas muestran que es posible el mejoramiento y recuperación de las características del morfo silvestre.

## ABSTRACT

Reproductive success in angiosperms is due, in large part, to the evolution of various morphological, physiological and genetic mechanisms that promote cross-fertilization increasing genetic variability. By increasing self-fertilization events, populations experience genetic depression by inbreeding, that is, an observed reduction in the adaptive value of a character due to the crossing of closely related genetic elements. Among the adaptations that avoid self-fertilization, are the herkogamy, the dichogamy, unisexuality of individuals and self-incompatibility systems. However, when these barriers are broken and intercrossing occurs between very close individuals, it may lead to the expression of characteristics or alterations in morphology and/or viability. *Nicotiana rastroensis* is a native self-incompatible species from Serra Geral, south of Santa Catarina Brazil. In previous observations, it was detected that the plants of *N. rastroensis* to be self-fertilized, prior to the activation of the incompatibility system (two days pre-anthesis) form seeds, but the progeny of the F<sub>1</sub> generation, when reaching reproductive stage, shows some individuals with malformations, ranging from a duplicate corolla to a decrease in viable pollen production. From these observations, the question arose: Can parental plants be heterozygous for some factors involved in the reproduction of *N. rastroensis*?

The main goal of this study was to describe the floral development of *N. rastroensis*, as well as the morphological and reproductive characteristics of the flower, and to analyze the alterations derived from the self-cross, in the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations, as well as in the backcrosses of the wild morpho by F<sub>1</sub>. Particularly, we intend to (1) describe the floral development of *N. rastroensis*; (2) describe the morphological characteristics of the wild flower of *N. rastroensis*; (3) characterize the male and female fertility from wild flowers of *N. rastroensis*, expressed by the quantity and viability of pollen grains, the number of ovules and seed germination percentage; (4) describe the morphological alterations as a product of self-pollinations (geitonogamy) in the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations, as well as in backcrosses of wild individuals (WT) and F<sub>1</sub> of *N. rastroensis* and; (5) determine the effects on male and female fertility in individuals of the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations and back crossing of *N. rastroensis*.

It was found that the development pattern of *N. rastroensis* is very similar to the one described for other solanaceous species; the flower morphology is also very similar to the species of *Alatae* section. Male fertility in the wild morpho is good, on average 696 pollen grains are produced with a viability above 80%; female fertility also has high values, with 334 ovules produced on average, with a germination percentage of 47%. When self-pollinations were performed, individuals of the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations, as well as the backcross, developed a double-flower, with appendages in the petals, with similar characteristics to the same petal, in addition, they presented variations in the length of the corolla, pistil and stamens. Male fertility decreases significantly as genetic variability of the wild morpho is lost due to self-pollination. Female fertility only declines in the percentage of seed germination, while ovule production does not show any drastic changes.

*N. rastroensis* self-incompatibility occurs between organs of the same flower, but not among flowers of the same individual. Wild morpho is heterozygous and is endogamically depressed, this is demonstrated by the fast occurrence of morphological and reproductive alterations in F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>. Backcrosses carried out show that it is possible the improvement and recovery of wild morpho characteristics.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Endogamia

El éxito reproductivo en las angiospermas se debe en gran parte a la evolución de varios mecanismos morfológicos, fisiológicos y genéticos, que promueven la fecundación cruzada aumentando la variabilidad genética (Lande y Schemske, 1985). Sin embargo, muchas especies de angiospermas producen flores que poseen, tanto a los órganos reproductivos masculinos (androceo), como femeninos (gineceo), en estas flores hermafroditas, la cercanía entre los órganos reproductivos de ambos sexos, favorece que el polen llegue al estigma de la misma flor, condición que aumenta la probabilidad de autofecundación (Kao y McCubbin, 1996; Lebel-Hardenack y Grant, 1997; Charlesworth, 2002; Barrett, 2002). Al aumentar los eventos de autofecundación, las poblaciones experimentan una depresión genética por endogamia, esto es, una reducción en el valor adaptativo de un carácter, debido a la cruce de elementos genéticos estrechamente relacionados (de Nettancourt, 1977, 2001; Lande y Schemske, 1985; Mauseth, 2003). Según Barrett y Kohn (1991), la depresión por endogamia permite la expresión de alelos recesivos perjudiciales, procedentes de ambos progenitores, ya que suele producirse por el cruzamiento genético entre parientes próximos (Harwood y Amos 1998). Para las especies con fecundación cruzada, el entrecruzamiento con individuos estrechamente emparentados, lleva a grandes problemas con consecuencias drásticas para algunos alelos, este fenómeno es común, tanto en plantas, como en animales (incluyendo al humano). El cruzamiento de individuos estrechamente emparentados, se manifestará en efectos deletéreos como las características ligadas a la adecuación (Kaback 2000).



## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Polinización y fecundación

La reproducción sexual en angiospermas involucra tres pasos: 1) formación de células haploides por meiosis, 2) formación de gametos y 3), la fusión de los gametos para formar el cigoto. Una importante consecuencia genética de la reproducción sexual es que se produce una descendencia con genotipos nuevos, producto de la recombinación (Silvertown y Charlesworth, 2001). Las variaciones genéticas dentro de las poblaciones de plantas están influenciadas por las interacciones entre factores genéticos y ecológicos, en donde los factores genéticos, tales como los sistemas reproductivos, la tasa de mutación y la dominancia pueden ser afectados por los factores ambientales (Naik, 1984).

La polinización es el proceso inicial en la reproducción sexual de las angiospermas, esta incluye la liberación de los granos de polen de la antera y su transporte al estigma, a través de diferentes vectores. Una vez que los tejidos femeninos (generalmente el estigma), reconocen el grano de polen, éste germina, produciendo un tubo polínico que crecerá a través del estilo hasta el ovario, dentro del tubo polínico se transportan los núcleos espermáticos, que son liberados dentro del saco embrionario para que ocurra la doble fecundación. La fecundación es el único evento en las plantas que involucra la interacción célula-célula entre los tejidos femeninos (estigma, estilo y ovario) y el gametofito masculino a través del tubo polínico. El estigma actúa como una superficie receptiva para atrapar los granos de polen, y en algunas especies forma una barrera inicial contra el polen indeseado. El tejido de transmisión del estilo sirve para extender y guiar al tubo polínico hacia el ovario (Márquez *et al.*, 2013).

En las flores hermafroditas, los órganos sexuales femeninos y masculinos se encuentran muy próximos, característica que promueve la fecundación entre individuos de la misma especie (fecundación cruzada) o dentro de un solo individuo (autofecundación; Barrett, 2002; Mauseth, 2003). En la autofecundación, un carpelo es polinizado por el polen de la misma flor (autogamia) o de diferente flor de la misma planta (geitonogamia). La alogamia se presenta, tanto por geitonogamia como por xenogamia,

ya que implica la transferencia de polen de una flor al estigma de la otra, ya sea dentro de una misma planta o entre diferentes plantas.

## **2.2. Adaptaciones que previenen la depresión por endogamia**

Los sistemas reproductivos encierran todos los aspectos de la expresión sexual en plantas que afectan a la contribución relativa de la siguiente generación, ya que incluyen adaptaciones que suscitan la fecundación cruzada (Dafni, 1992). Entre las adaptaciones morfofisiológicas, que evitan la autofecundación, la hercogamia se refiere a la separación espacial de las estructuras sexuales, es decir, la posición espacial de las anteras con respecto al estigma. Por otro lado, la dicogamia comprende la separación temporal en la maduración de los órganos sexuales, cuando las anteras maduran antes de que el estigma se encuentre receptivo, se denomina protandria, por el contrario, si el estigma madura antes que los granos de polen, se llama protoginia (Darwin, 1859; Massinga *et al.*, 2005; Rea y Nasrallah, 2008). Otra adaptación es la unisexualidad, sólo el 4% de las angiospermas son dioicas, con flores estaminadas separadas de flores pistiladas en dos plantas diferentes. También existen angiospermas monoicas con flores femeninas y masculinas en la misma planta (Bawa y Beach, 1981; Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993; Ainsworth, 2000; Barrett, 2002; Ingrouille y Eddi, 2006; Pugnaire y Valladares, 2007).

### **2.2.1. Sistemas de autoincompatibilidad (AI)**

Uno de los mecanismos más usado por las angiospermas, para evitar la endogamia y promover la generación y mantenimiento de la diversidad genética, es la autoincompatibilidad (AI), la cual se define como la incapacidad de las plantas hermafroditas, fértiles, para producir cigotos después de la autopolinización. Este proceso se encuentra controlado genéticamente, permite al pistilo reconocer y rechazar el polen propio o el polen genéticamente muy cercano. Si un grano de polen de una planta autoincompatible llega a su propio estigma, o en el estigma de una planta genéticamente relacionada, el polen no germina o produce un tubo polínico con crecimiento deficiente, que no alcanza el ovario (de Nettancourt, 1977).

El fuerte control genético que ejercen los sistemas de AI restringe fuertemente la introgresión con los padres y las cruza con otros miembros de la progenie. De esta manera, la polinización cruzada aumenta la capacidad de sobrevivencia y reproducción, y contribuye así a la diversidad genética de la siguiente generación (Jiménez-Durán y Cruz-García, 2011). En muchos casos, la incompatibilidad está controlada genéticamente por un solo locus multialélico, conocido como el locus S, el cual determina la especificidad del reconocimiento o rechazo del polen. Esto implica que los productos del locus S, expresados en el polen y en el pistilo, interaccionan para determinar si un polen dado es autocompatible o autoincompatible (Dickinson, 1990). El locus S incluye dos genes estrechamente ligados. Una unidad transcripcional codifica la determinante masculina con expresión específica en el polen, y la otra codifica a la femenina, con expresión exclusiva en el pistilo (Jiménez-Durán y Cruz-García, 2011). Algunas plantas, con flores hermafroditas, han desarrollado sistemas de incompatibilidad que promueven la polinización cruzada. Los sistemas de incompatibilidad se clasifican en heteromórficos y homomórficos.

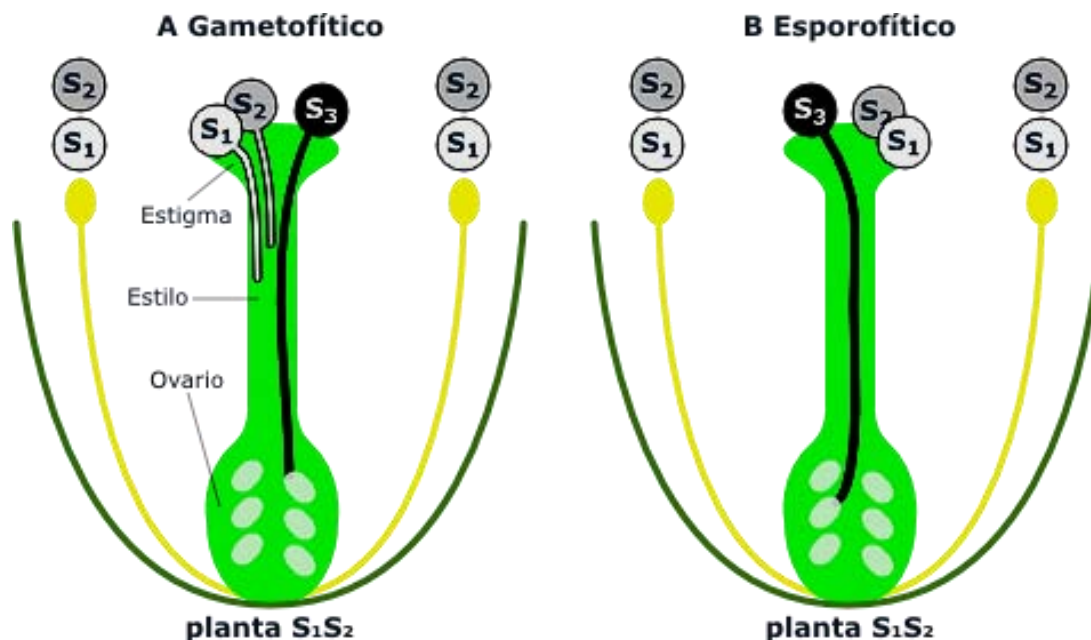
Los sistemas de incompatibilidad heteromórficos están controlados también por un locus S, el cual contiene de tres a siete genes, que controlan el dimorfismo floral y los sistemas de incompatibilidad (Labone *et al.*, 2009). Estos sistemas presentan diferencias morfológicas que pueden ser vistas en el esporofito. Dependiendo de la arquitectura floral, la incompatibilidad heteromórfica se puede distinguir en dos tipos de morfos florales en las especies distílicas, o en tres morfos florales en el caso de las especies tristílicas, cada uno de estos sistemas difieren en la altura del estilo, altura de la antera, tamaño y cantidad del polen. Además, la incompatibilidad heteromórfica ayuda a promover la fecundación cruzada, y el reconocimiento bioquímico del polen propio ayuda a evitar la autofecundación (Ingrouille, 1992; Raghavan, 1997; Pugnaire y Valladares, 2007).

En el sistema de incompatibilidad homomórfico existe un solo morfo floral en la población y la prevención de la autogamia depende únicamente de una respuesta químico-fisiológica, dicha autoincompatibilidad, puede ser gametofítica o esporofítica, y solo se diferencian por el sitio de expresión del alelo S (Fig. 1) (De Nettancourt, 1977;

Frankling-Tong *et al.*, 2003; Pugnaire y Valladares, 2007). Los sistemas de autoincompatibilidad se distribuyen ampliamente en las angiospermas y están presentes en 91 de las 271 familias descritas (Dickinson *et al.*, 1992).

La autoincompatibilidad gametofítica está controlada generalmente por un locus S, con un gran número de alelos, donde cada planta contiene uno o dos diferentes alelos S (por ejemplo S<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>S<sub>4</sub>), de modo que el pistilo puede ser homócigo o heterócigo y el 50% de los granos de polen llevan un alelo S y el otro 50% llevan el otro alelo S. cuando el polen llega sobre el estigma, éste germina y produce un tubo polínico que crece a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, si el grano de polen haploide comparte un alelo con el pistilo, el crecimiento del tubo polínico se detiene generalmente a nivel del estilo (Levin, 1986; Silvertown y Charlesworth, 2001; Fig. 1A). La autoincompatibilidad gametofítica se ha descrito en más de 60 familias de plantas con flores (Kao y McCubbien, 1996), siendo estudiada con mayor detalle a nivel molecular en Papaveraceae y en miembros de la familia Solanaceae, incluyendo a *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum* y *Lycopersicum*.

La autoincompatibilidad esporofítica está controlada por un locus S, con varios alelos, cada planta tiene dos alelos diferentes y pueden ser homócigo o heterócigo, pero la especificidad del polen, así como la del pistilo está controlada por el tejido esporofítico, de manera que cada grano de polen se comporta como si tuviera dos alelos S, a pesar de que solo contenga uno, de expresión haploide. Si el polen proviene de una planta que contenga un alelo en común con el tejido parental, el crecimiento del tubo polínico se inhibe en la superficie del estigma (Levin, 1986; Silvertown y Charlesworth, 2001; Fig. 1B). La autoincompatibilidad esporofítica ha sido estudiada en tres familias esencialmente Brassicaceae, Asteraceae y Convolvulaceae, siendo *Brassica* la especie más estudiada (Kao y McCubbien, 1996).



**Figura. 1. Sistemas de incompatibilidad.** Comúnmente, las plantas rechazan el polen que corresponde a su propio tipo. Este rechazo es controlado por genes en el locus de autoincompatibilidad (locus-S). Sistema de incompatibilidad gametofítico: el tipo de polen es controlado por el genotipo haploide de los granos de polen. Una planta heterocigota para dos alelos del locus-S produce polen incompatible de dos tipos ( $S_1/S_2$ ). Solo el polen incompatible del tipo  $S_3$  es aceptado. Otro tipo de polen es rechazado durante su transmisión en el estilo (A). Sistema de incompatibilidad esporofítico: el tipo de polen es controlado por el locus-S diploide de la planta que lo produce. La dominancia es posible (p.e.  $S_2$  dominante) y la planta produce polen de un solo tipo. Dicho polen no puede fertilizar una planta con un alelo  $S_2$ . El polen es rechazado en la superficie del estigma (B). Las letras ( $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ ) indican el genotipo del grano de polen y del estigma. Tomado de Silvertown y Charlesworth (2001).

### 2.3. Sistema de AI en Solanaceae

En la familia Solanaceae, la respuesta de autoincompatibilidad se caracteriza porque, tanto los granos de polen compatibles como los incompatibles son hidratados, y tienen una germinación normal sobre el estigma. Inicialmente ambos tipos de tubos polínicos son morfológicamente iguales. Sin embargo, el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles es inhibido a nivel del tercer segmento superior del estilo. La inhibición es caracterizada por la deposición anormal de calosa y engrosamiento de la pared del tubo polínico. Los estudios clásicos de genética han establecido que, en

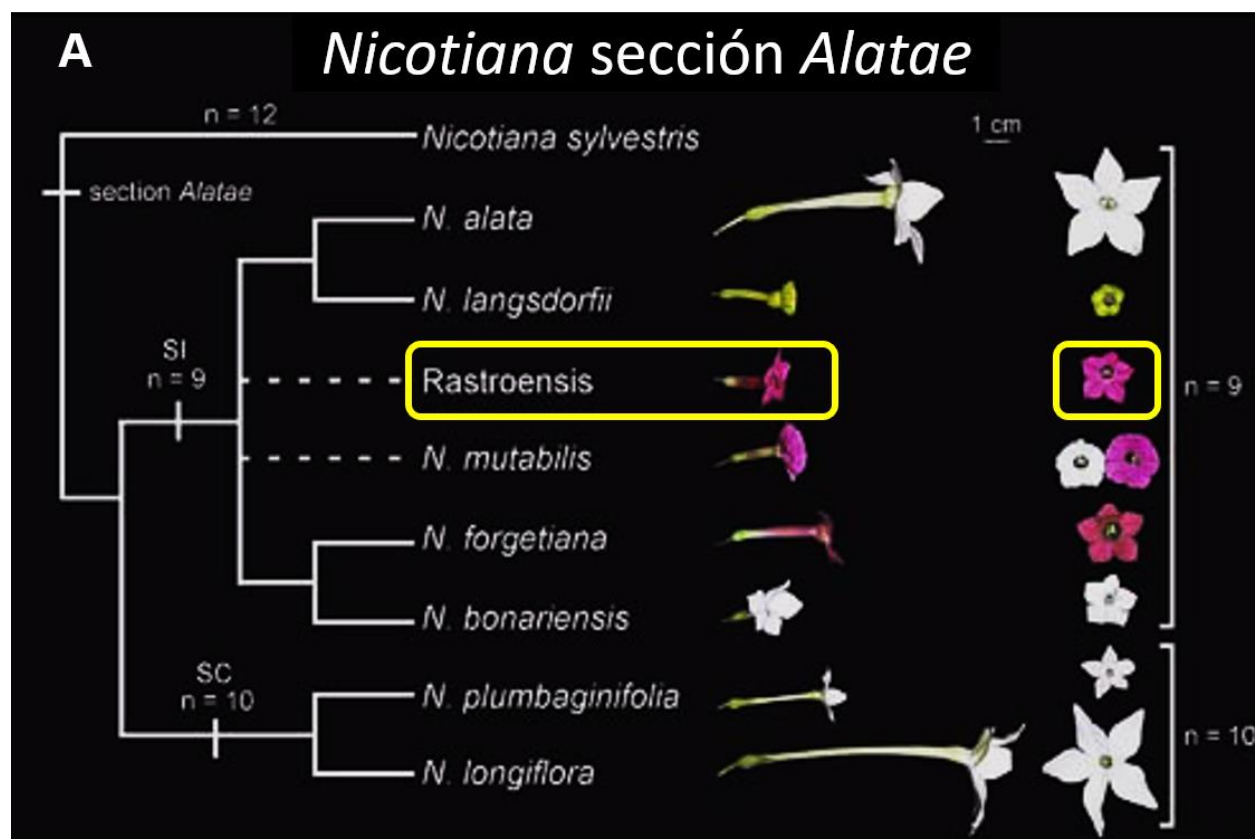
muchas especies, la autoincompatibilidad está controlada por un locus multialélico S (de Nettancourt, 1977; Kao y McCubbin, 1996; Takayama e Isogai, 2005).

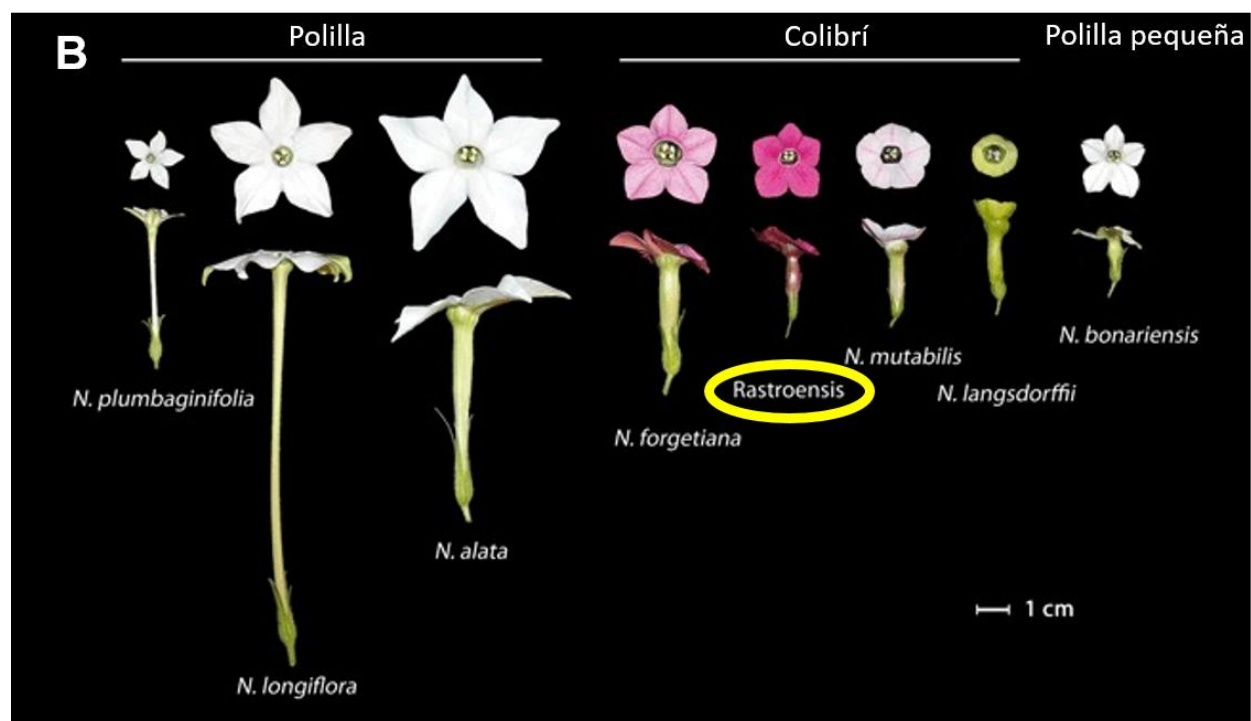
En las familias Solanaceae (*Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*), Rosaceae (*Prunus*) y Scrophulariaceae (*Antirrhinum*), los productos del locus S en el pistilo son proteínas con actividad ribonucleasa. Estas proteínas son conocidas como S-RNasas, las cuales son glicoproteínas que se secretan hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, por donde se dirige el tubo polínico hacia al ovario (Anderson *et al.*, 1986; McClure *et al.*, 1989; McClure *et al.*, 1993; Kao y Tsukamoto, 2004; de Nettancourt, 2001; McClure y Franklin-Tong, 2006). El lugar en donde las S-RNasas acceden al citoplasma del tubo polínico es donde causan la degradación del RNA de los tubos polínicos incompatibles (McClure *et al.*, 1990). Esta actividad citotóxica afecta el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles, interfiriendo con el programa de expresión génica del polen (McClure y Franklin-Tong, 2006). Cuando las S-RNasas pierden su actividad, no se observa degradación del RNA y las plantas no presentan el fenotipo de rechazo del polen (Huang *et al.*, 1994).

El producto del locus S, en el polen, se identificó en *Petunia inflata* (Sijacic *et al.*, 2004). Este gen se conoce como *SLF* (S-locus F-box gene) en solanáceas o *SFB* (S-haplotype-specific F-box protein) en Rosaceae, y es miembro de una familia de proteínas que contiene una caja F hacia su extremo amino terminal. La expresión de *SLF* es haplotipo S-específica, y se restringe al polen y por lo tanto es la determinante masculina (Sijacic *et al.*, 2004; Yamame y Tao, 2009). Los miembros de la familia de proteínas con caja F se asocian con la vía de degradación de proteínas, por el proteosoma 26S (Sullivan *et al.*, 2003). La proteína *SLF* podría funcionar como una enzima ligasa tipo E3 (Sijacic *et al.*, 2004). La degradación de proteínas vía el proteosoma 26S involucra el marcaje por poliubiquitinación de las proteínas que se van a degradar. En este proceso las enzimas ligasas E3 representan un paso crucial en el control de la poliubiquitilación de la proteína blanco, ya que reconocen la señal de ubiquitilación en la proteína seleccionada y coordinan la transferencia de la ubiquitina (proteína de 76 kD) desde la ligasa E2, a un residuo de lisina de la proteína blanco (Sullivan *et al.*, 2003).

## 2.4. Sistema de AI en *Nicotiana*

La sección *Alatae* del género *Nicotiana* es un grupo monofilético, que incluye especies tanto compatibles como incompatibles (Fig. 2A), compuesta por ocho especies que exhiben una gran diversidad en la morfología floral, el tamaño de la flor, el sistema de cruce y los polinizadores (Lee *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2010; Fig. 2B). Las especies autoincompatibles tienen un número cromosómico de  $n=9$  y comprenden a *N. alata*, *N. forgetiana*, *N. langsdorffii*, *N. bonariensis*, *N. mutabilis* y la especie de la presente investigación, *N. rastroensis*; se restringen al sudeste de Brasil, Paraguay, Uruguay y el este de Argentina. Las especies autocompatibles son *N. longiflora* y *N. plumbaginifolia*, ambas con número cromosómico  $n=10$  y tienen una distribución más amplia. *Nicotiana longiflora* se encuentra en el norte de Argentina, sur de Bolivia, Paraguay y Uruguay (Kaczorowski *et al.*, 2005; Raguso *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008).





**Figura. 2.** Especies de la sección *Alatae* del género *Nicotiana*. Filogenia tomada de Lee *et al.* (2008), se muestra la relación entre los clados, el grupo extremo y el número cromosómico (A). Morfología floral asociada a los polinizadores (tomado de Kaczorowski *et al.*, 2012; B).

## 2.5. El caso de *Nicotiana rastroensis*

En la actualidad se menciona que las especies autoincompatibles evitan la autofecundación para prevenir los efectos deletéreos de la endogamia; sin embargo, los datos que documentan que tipo de malformaciones y en qué generación, después de la autofecundación, aparecen éstos son muy limitados.

*Nicotiana rastroensis* es una especie originaria de Serra Geral al sur de Santa Catarina Brasil, ocupa valles aislados de montañas (Lee *et al.*, 2008). *N. rastroensis* presenta una antesis crepuscular, es decir, su flor abre en la tarde. Presenta volúmenes de néctar bajos, sin embargo, la calidad energética es de las más altas que se conocen para el género. La coloración y forma de la corola, así como las características del néctar le confieren un síndrome de polinización ornitófila (por colibríes) aunque también recibe la visita de abejas de la familia Halictidae y abejorros del género *Bombus* (Kaczorowski *et al.*, 2005). Produce fragancias relativamente débiles, que se componen de terpenoides



y alcoholes aromáticos y aldehídos, además, produce nicotinato de metilo (Raguso *et al.*, 2006).

Las semillas fueron proporcionadas por el Dr. T.P. Holtsford (Universidad de Missouri, EUA), al Dr. Felipe Cruz García de la Facultad de Química. Las semillas provienen de colectas realizadas en Bom Jardim da Serra, Rio do Rastro, Brasil ( $28^{\circ} 23' S$  y  $49^{\circ} 33' W$ ), una región con clima templado, a 1500 msnm, con una temperatura media anual de  $12^{\circ} C$  y temperaturas mínimas que han alcanzado  $-17^{\circ} C$  (Fig. 3; Kaczorowski *et al.*, 2005; Raguso *et al.*, 2006).



**Figura 3. Ubicación de la población natural de *Nicotiana rastroensis* en Brasil.**

En una colaboración con el grupo del Dr. Felipe Cruz García, se detectó que las plantas de *N. rastroensis* eran autoincompatibles, debido a que todas las flores que producía la misma planta no eran fecundadas y abortaban.

Durante un experimento previo, en el cual se autofecundaron flores de la planta madre (determinada aquí como WT), algunos individuos de la F<sub>1</sub> mostraron malformaciones, que iban desde una corola duplicada hasta una disminución en la producción de polen viable, una característica poco habitual, ya que se argumenta que los efectos de la depresión endogámica no aparecen de inmediato, ni había sido reportada para ninguna especie de *Nicotiana*, sugiriendo que los individuos cultivados presentaban algún nivel de depresión endogámica.

A partir de estas observaciones, se planteó la pregunta ¿la planta parental puede ser heterocigótica para algunos factores involucrados en la reproducción de *N. rastroensis*? El primer paso para responder esa incógnita, fue evaluar algunos efectos visibles y cuantificables de la depresión por endogamia en *N. rastroensis*, utilizando como sistema de estudio una población segregante, obtenida de las plantas silvestres autoincompatibles de esta especie.

### III. HIPÓTESIS

Si plantas de *Nicotiana rastroensis* provienen de una población que tiene una depresión endogámica, la inducción artificial de la autofecundación en el morfo silvestre dará como resultado una disminución en la variabilidad genética de la progenie, misma que se verá reflejada en la morfología de las nuevas plantas y/o en sus características reproductivas. Por otro lado, al realizar retrocruzas, la variabilidad genética aumentará en la nueva progenie, de manera que los fenotipos obtenidos serán más similares a los del morfo silvestre.

### IV. OBJETIVOS

#### Objetivo general

- Describir el desarrollo floral de *Nicotiana rastroensis*, así como las características morfológicas y reproductivas de la flor, y analizar las alteraciones derivadas de la autofecundación en las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, así como en las retrocruzas del morfo silvestre por F<sub>1</sub>.

#### Objetivos particulares

- Describir el desarrollo y morfología floral de *N. rastroensis* en plantas silvestres (WT).
- Caracterizar la fertilidad masculina y femenina de la flor silvestre de las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> y retrocruzas de *N. rastroensis*, expresadas por la cantidad y viabilidad de los granos de polen, la cantidad de óvulos y porcentaje de germinación de semillas.
- Describir las alteraciones morfológicas, producto de las autopolinizaciones (geitonogamia), en las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, así como en retrocruzas de individuos silvestres (WT) y F<sub>1</sub> de *N. rastroensis*.
- Determinar los efectos en la fertilidad masculina y femenina en los individuos de las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, y retrocruzas de *N. rastroensis*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cruzas autóгамas y obtención de las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>

Debido a que *Nicotiana rastroensis* es una especie autoincompatible, las polinizaciones se realizaron en etapa de preantesis (antes de activarse el sistema de incompatibilidad, aproximadamente dos días previos a la antesis), se emascularon las flores y se adicionó exudado de otras flores al estigma polinizado. El polen fue colectado de otras flores del mismo individuo (geitonogamia) para obtener una línea genética (llamada F<sub>1</sub>). Para ello se utilizó una planta silvestre de *N. rastroensis* (llamada WT). Se cosecharon las semillas obtenidas de esta autopolinización y que representan a la F<sub>1</sub>, se germinaron en condiciones controladas en el invernadero. Para obtener la generación F<sub>2</sub> se autopolinizó una planta F<sub>1</sub> que presentó alteraciones en la corola (Fig. 4). Todas las plantas se mantuvieron en el invernadero de la Facultad de Química de la UNAM, bajo condiciones estándar, controladas.

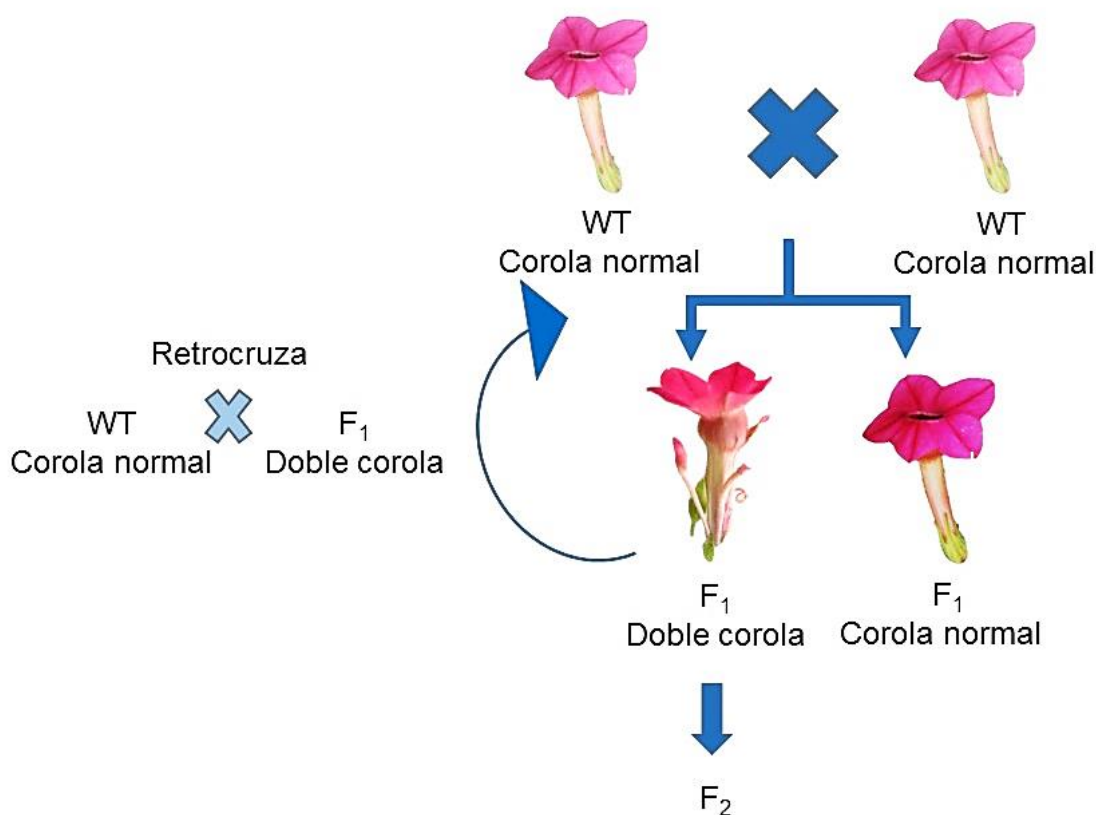


Figura 4. Modelo experimental de las cruzas realizadas en *Nicotiana rastroensis*.

## **5.2. Análisis morfológico e histológico**

Para evaluar las malformaciones en la corola, formación de óvulos y polen de los progenitores WT, así como de las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza: se fijaron flores en antesis en FAA (Formaldehído, ácido acético, etanol 96% y agua destilada). Para eliminar el exceso de fijador de las muestras, éstas se lavaron dos veces con agua y se deshidrataron en etanoles graduales (70%, 85%, 96%, 100% y 100%), durante una hora cada uno. Todo el material primeramente se analizó con microscopio estereoscópico y se seleccionaron algunas muestras para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido (MEB), una parte se incluyó en LR-White y otra en Paraplast.

## **5.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Para conocer el efecto de las autopolinizaciones, se disectaron total o parcialmente botones y flores en diferentes etapas de desarrollo, removiendo los sépalos. Una vez llevada a cabo la deshidratación en etanoles graduales, se procesó el material en una desecadora de punto crítico (CPD-030 Bal-Tec) con CO<sub>2</sub>. Este material se montó en portamuestras metálicos sobre cinta conductora de carbón y se cubrieron con oro en una ionizadora Denton VacuumDesk-II, para posteriormente observarlos en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310VL y se tomaron las fotografías correspondientes (López *et al.*, 2005).

## **5.4. Inclusión en LR-White**

Después de la deshidratación, las muestras se colocaron en una mezcla de resina LR-White:etanol absoluto (1:1), durante 24 horas. Posteriormente se impregnaron en LR-White puro, durante 24 horas y las muestras se polimerizaron en ausencia de oxígeno en cápsulas de gelatina, en una estufa a 56°C. Se realizaron cortes de 1-2µm de grosor en un ultramicrotomo JMC-MT 990, con cuchillas de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina 1% (López *et al.*, 2005).

### **5.5. Inclusión en Paraplast**

En seguida de la deshidratación, los botones florales y flores en distintas etapas de desarrollo, se pasaron inicialmente en xilol por 15 minutos y posteriormente por mezclas xilol:paraplast (1:1), durante 12 horas como tiempo mínimo y 24 horas como máximo, dentro de una estufa, a una temperatura de 56°C. Posteriormente las muestras se impregnaron con paraplast puro, durante 24 horas y se incluyeron en paraplast puro, en moldes metálicos. Se obtuvieron cortes de 4–8 µm de grosor en un micrótopo de rotación American Optical 820. Los cortes se desparafinaron durante una hora en una estufa a 56°C y se pasaron por tres cambios de xilol, por un cambio en la mezcla de xilol-etanol absoluto (1:1) y posteriormente se hidrataron en etanol 96 %, durante tres minutos en cada uno. Posteriormente se tiñeron con safranina-verde rápido en metilcelosolve (López *et al.*, 2005).

### **5.6. Producción de granos de polen**

Para evaluar la producción de polen, se realizó la técnica de Cruden (1983). Las anteras (aún cerradas) de cada flor en antesis se colectaron y colocaron en un vial, se metieron en una cámara de vacío con sílica gel, hasta que abrieron, se retiraron las anteras y al polen contenido en el vial, se le agregó detergente comercial con un cierto volumen de agua, para evitar la aglutinación de polen, se tomaron alícuotas de polen y se registró el número de éstos en una cámara de Neubauer y se calculó el número de granos de polen producidos por flor.

### **5.7. Viabilidad de granos de polen**

Para evaluar la viabilidad del polen, mediante la germinación *in vitro* de los granos de polen, se colectó polen fresco de las cinco anteras en antesis de cada flor, en tubos tipo Falcon, de 15 ml y se mezcló con 6 ml de medio de cultivo líquido. La mezcla se colocó en cajas de vidrio estériles, de 100 ml y se incubó a 30 °C por 16 horas. Se tomaron muestras, se observaron al microscopio de luz y se contó el total de granos de polen con y sin tubos polínicos.

### **5.8. Producción de óvulos**

Para evaluar la cantidad de óvulos producidos, de cada cruce se utilizaron 30 ovarios maduros, fijados en FAA, se disectaron y se contaron los óvulos en su interior desprendiéndolos con aguja de disección, el conteo se hizo bajo microscopio estereoscópico y con ayuda de un contador manual.

### **5.9. Viabilidad de semillas**

Se colectaron semillas de los frutos obtenidos en cada cruce, el número de éstas fue variable, debido a que los frutos son cápsulas que dispersan las semillas activamente (por explosión), además las semillas miden menos de 1 mm, por lo que fue difícil retenerlas, inclusive embolsando las flores. Las semillas se pusieron a germinar en tierra esterilizada, bajo condiciones de invernadero y después de un mes (tiempo promedio que tardan para germinar) se hizo el conteo, una semilla se consideró como germinada una vez que se observaron los cotiledones.

### **5.10. Análisis de datos**

La producción de granos de polen, la viabilidad del mismo, el número de óvulos producidos y el porcentaje de germinación se sometieron a una prueba de normalidad, ésta fue negativa, por lo que cada bloque se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. En todos los casos se asumió como hipótesis nula, que los parámetros medidos eran iguales para todas las generaciones y, como hipótesis alterna se asumió que había diferencia entre la  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruza con respecto a la WT. Se consideró un error alfa de 0.05.

### **5.11. Hercogamia**

Debido a que se observó que en las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruza, la longitud del pistilo y los estambres variaban con respecto a la longitud de la corola, se midieron dichas estructuras en 11 flores de cada generación, para ello se utilizó un vernier electrónico, el grupo control fue el morfo WT y se comparó con el resto de los grupos. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con un error alfa de 0.05.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Desarrollo de las flores silvestres (WT)

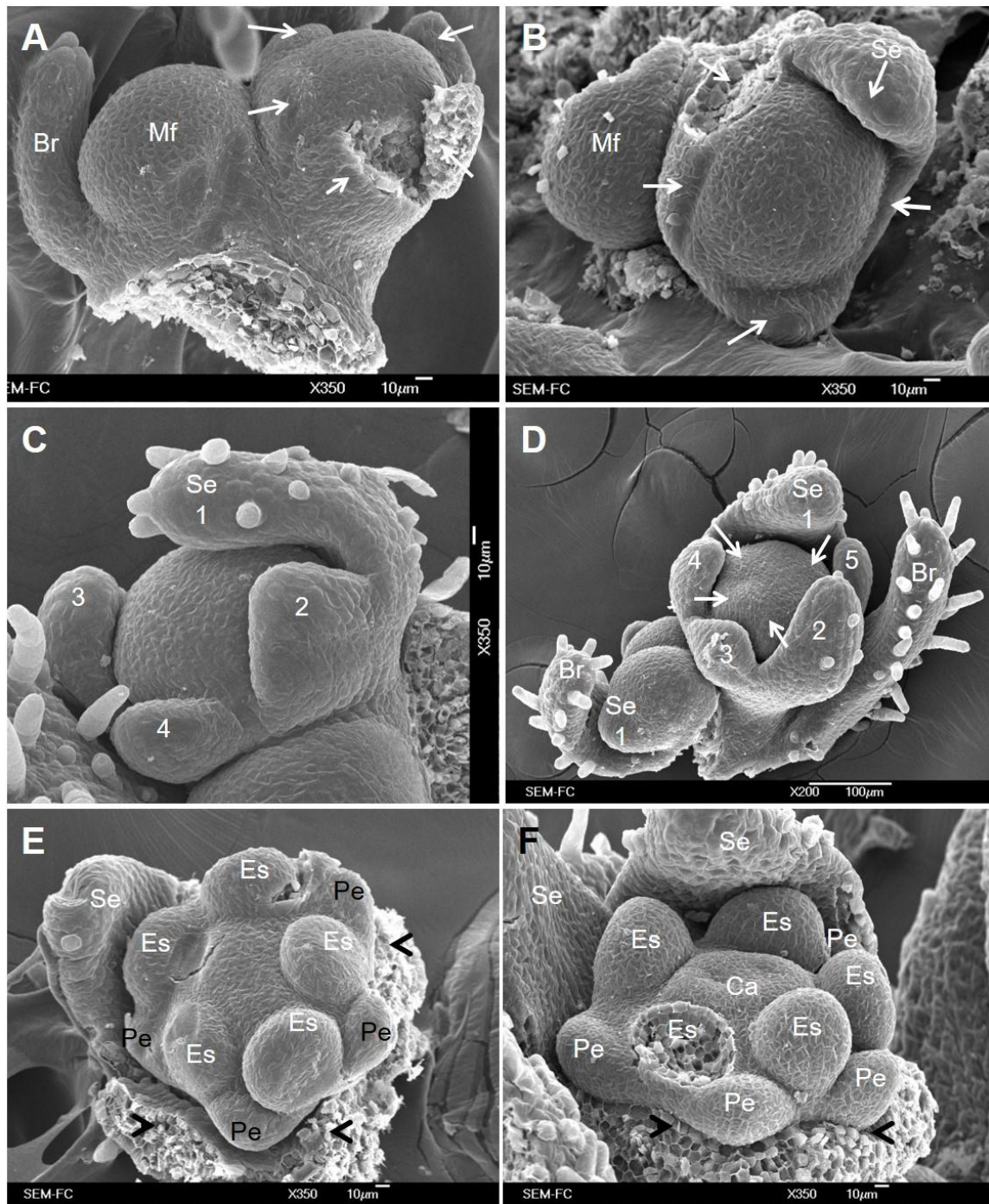
El meristemo floral se encuentra cubierto por una bráctea (Fig. 5A). El desarrollo del primer verticilo (cáliz) es asincrónico. Se origina el primer primordio del sépalo y los cuatro primordios subsecuentes surgen alternamente en posiciones variables. Cuando el primer primordio de sépalo comienza a engrosarse y curvarse, surgen tricomas en la cara abaxial; los otros cuatro primordios también presentan dichas características conforme van surgiendo (Figs. 5A-C).

En la Fig. 5D se aprecia como se da el surgimiento asincrónico de los primordios de este verticilo y sólo se formaron cinco sépalos, por lo que el cáliz es pentámero, y se distinguen ya los primordios del segundo verticilo floral, la corola, (flechas rosas). Los pétalos surgen alternos a los sépalos y también son asincrónicos (Fig. 5D).

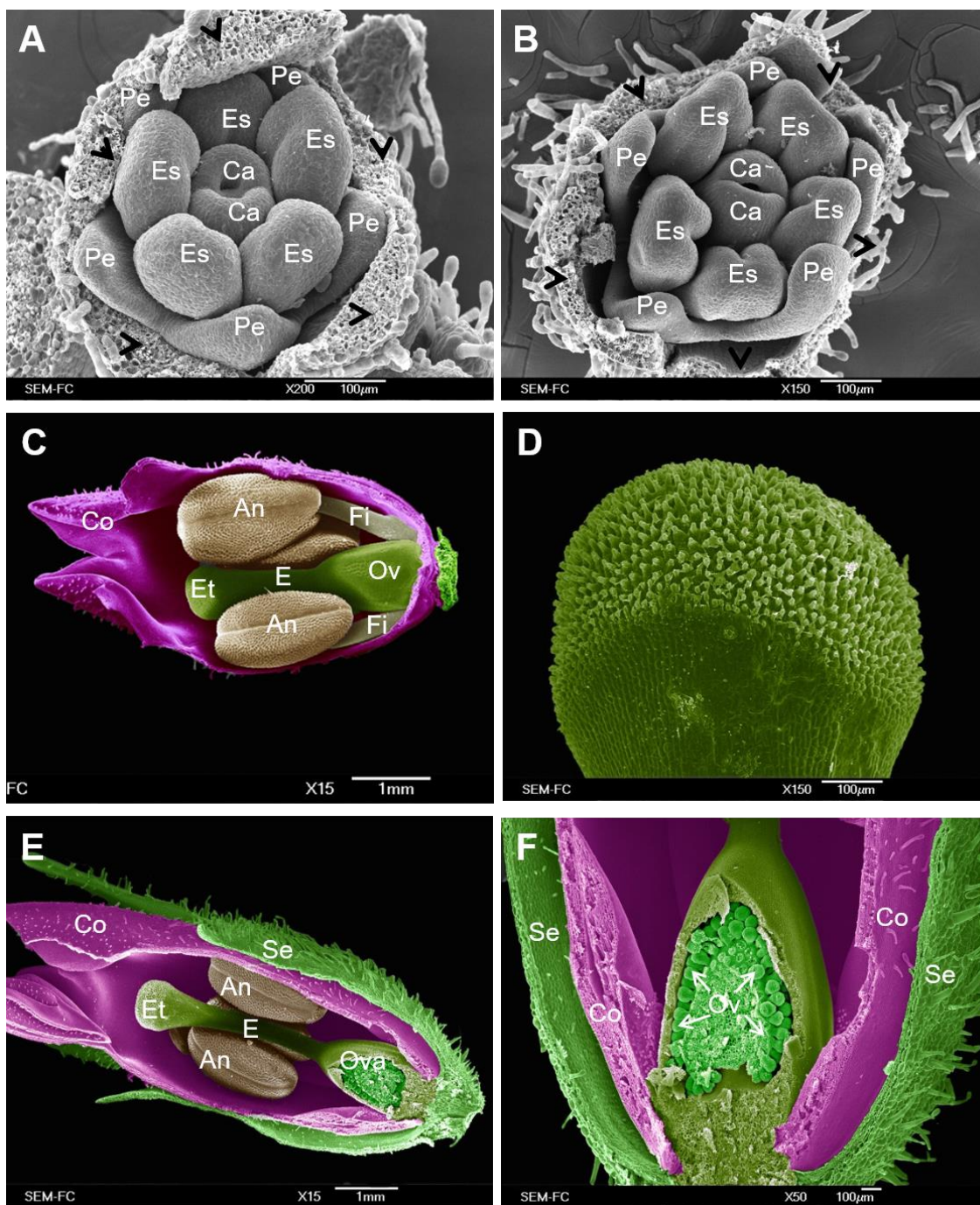
Seguido de la formación de los pétalos, el tercer verticilo comienza a desarrollarse, el androceo. Los cinco primordios de estambres comienzan a surgir de forma simultánea (Fig. 5E). Posteriormente ocurre la iniciación del cuarto verticilo, el gineceo, el cual se inicia con la formación de dos primordios carpelares ubicados en el centro del botón floral (Fig. 5F).

Los primordios de carpelos se van diferenciando y comienzan a adquirir una forma cilíndrica y una hendidura se hace evidente. Para esta etapa los cinco primordios de estambres comienzan a alargarse y a ensancharse para formar las estructuras correspondientes a los lóbulos de la antera (Fig. 6A). Los dos carpelos se han alargado y la hendidura se va cerrando para formar la cavidad del ovario. Al mismo tiempo, cada primordio de estambre se ha alargado para formar el filamento y las anteras comienzan a verse bilobuladas, posteriormente se distinguen tetrasporangiadas (Fig. 6B). Los cinco primordios de pétalos también se alargan, para proteger a los verticilos internos (Fig. 6C).





**Figura 5. Morfología del desarrollo de flores WT de *Nicotiana glauca*.** Ápice de la inflorescencia mostrando dos botones florales (A). Dos botones florales, en el mayor se han iniciado la diferenciación de los sépalos (B). Engrosamiento y curvamiento de los sépalos (C). Cáliz pentámero, los números señalan la secuencia de surgimiento de los sépalos. Las flechas indican los primordios de estambres (D). Cinco estambres en desarrollo y surgimiento de los primordios de pétalos (E). Botón floral con pétalos, estambres y en el centro se aprecia el surgimiento de dos primordios de carpelo (F). Br: bráctea; Ca: carpelo; Es: estambre; Mf: meristemo floral; Pe: pétalo; Se: sépalo. Flecha blanca = primordio de sépalo. Cabeza de flecha = sépalos removidos.



**Figura 6. Desarrollo de flores silvestres de *Nicotiana rastroensis* en etapa avanzada.** Presencia de cinco sépalos (removidos), cinco pétalos y cinco estambres y dos carpelos en desarrollo (A). Las anteras son tetrasporangias (B). Botón floral donde se diferencian los estambres con sus filamentos y anteras, en donde se ve la línea de dehiscencia, el pistilo con estigma, un estilo corto y ovario y la cara adaxial de la corola presenta tricomas (C). Estigma con papilas en desarrollo (D). Flor con los cuatro verticilos florales. El cáliz y la corola con tricomas en la cara adaxial (E). Óvulos en desarrollo (F).

An: antera; Ca: carpelo; Co: corola; E: estilo; Es: estambre; Et: estigma; Fi: filamento; Ov: óvulos; Ova: ovario; Pe: pétalo; Se: sépalo; Cabeza de flecha = sépalos removidos.

El gineceo sincárpico comienza a desarrollarse por la fusión y alargamiento de los carpelos, lo que resulta en un ovario ensanchado, un estilo alargado y un estigma evidentes a simple vista y en su forma característica (Fig. 6C). Además, para esta etapa, el estigma comienza a formar cientos de papilas estigmáticas (Fig. 6D).

En etapas intermedias de desarrollo, el gineceo se caracteriza por un ovario con cientos de óvulos en desarrollo en su interior, un estilo alargado que eleva al estigma más allá de las anteras. El estigma es prominente y ligeramente bilobulado (Fig. 6E).

Conforme los sépalos y pétalos se elongan, surgen varios tricomas, tanto en la cara adaxial como en la abaxial. Las anteras son bitecas, con una incipiente línea de dehiscencia longitudinal más evidente y los filamentos comienzan a alcanzar tamaños variables (Fig. 6E).

La corola tiene un crecimiento tubular en la base, pero los ápices de los pétalos se encuentran separados. Lo mismo sucede, en un principio, con el cáliz y en un algún momento deja de crecer en comparación con la corola. Tanto el cáliz como la corola presentan tricomas en la cara abaxial, siendo más abundantes y largos en el cáliz (Fig. 6F).

## **6.2. Morfología floral de las plantas silvestres (WT)**

Las flores silvestres de *Nicotiana rastransis* (WT) son hermafroditas, actinomorfas y tubulares (Fig. 7A). El cáliz está formado por cinco sépalos, cuya base está fusionada pero los ápices son libres (Fig. 7B), en la epidermis abaxial presentan tricomas glandulares, la epidermis adaxial es parenquimática y presenta tricomas cortos y escasos, la subepidermis está lignificada (Figs. 7C y D).

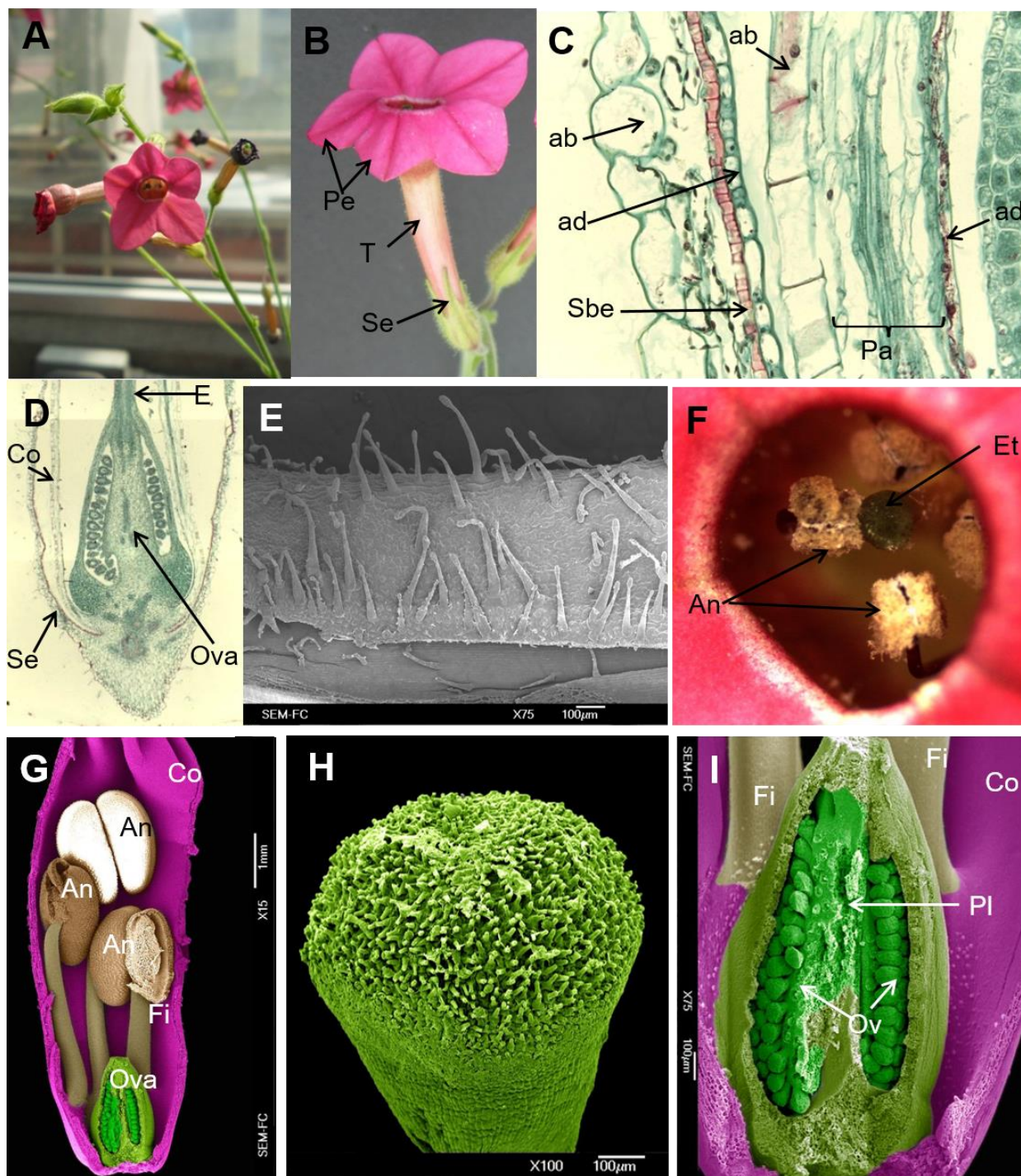
La corola es gamopétala, de color rosa y consta de cinco pétalos que se encuentran fusionados formando un tubo floral, excepto en el extremo apical, donde se distinguen cinco lóbulos, redondeados, libres y tiene una longitud promedio de  $23.26 \pm 0.068$  mm. Los pétalos son dos o tres veces más largos que los sépalos y presentan tricomas en el envés (Fig. 7E).

El androceo consta de cinco estambres y tienen un filamento largo, que sostiene a una antera, la longitud promedio de los estambres es  $20.61 \pm 0.138$  mm. Las anteras son de color café y basifijas, constan de dos lóbulos y son tetrasporangiadas, con una línea de dehiscencia longitudinal, extrorsa (Figs. 7F y G).

El gineceo es sincárpico y bicarpelar. El estigma es bilobulado y de color verde en anthesis, con papilas estigmáticas que presentan abundante secreción en la superficie (Fig. 7F y H). El estigma se presenta por arriba de las anteras (herkogamia por aproximación, para evitar la autopolinización), pero sin sobresalir del tubo de la corola. El ovario es súpero y encierra a cientos de óvulos, que aparecen unidos a una placenta axial (Figs. 7D, I), la longitud del pistilo es de  $22.46 \pm 0.131$  mm.

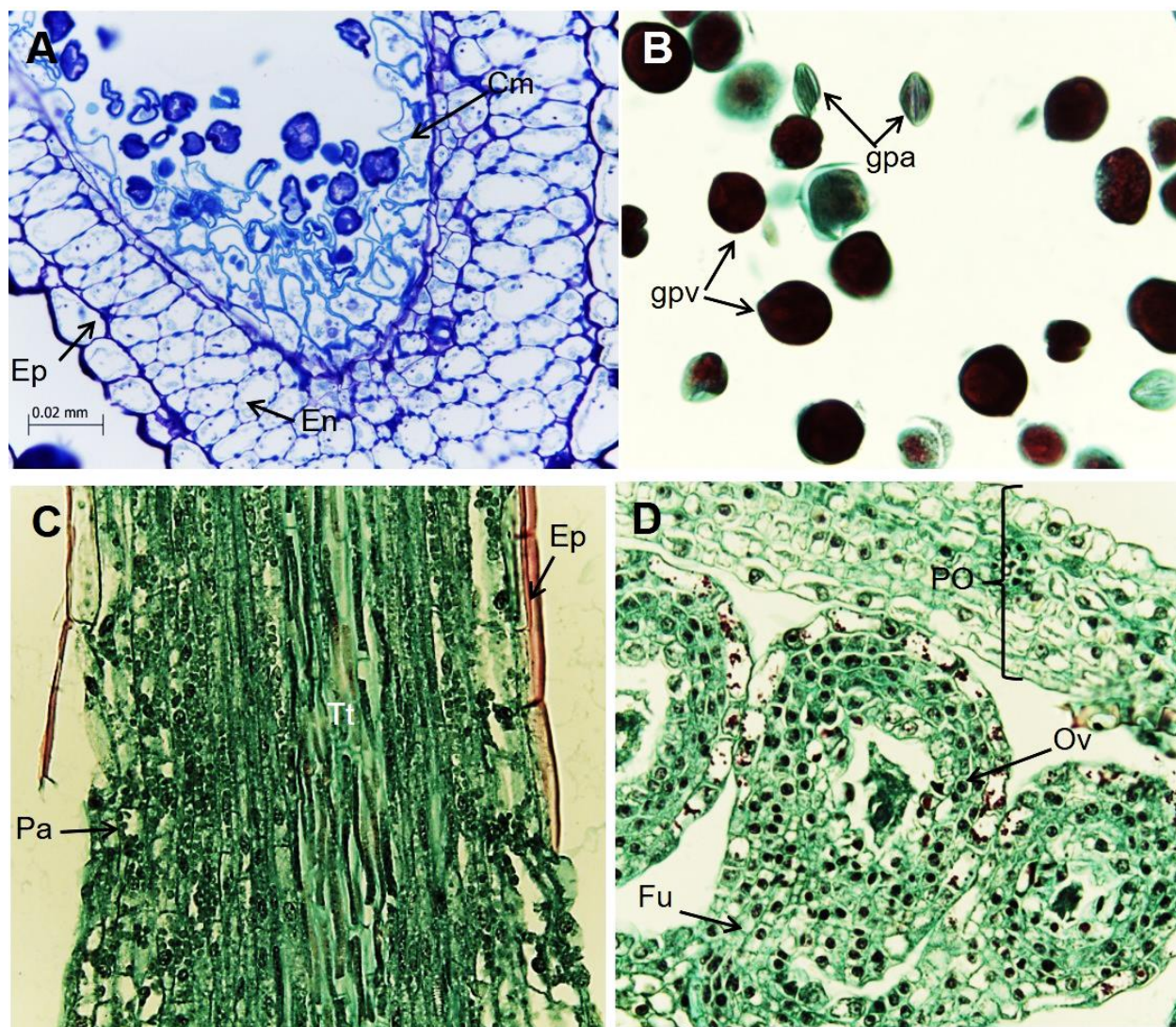
La pared de la antera madura está constituida por una epidermis y un endotecio, con engrosamientos lignificados, que al romperse permite la dehiscencia de la antera y la liberación de los granos de polen (Fig. 8A). Los granos de polen pueden ser de dos tipos, granos de polen bien formados (tricelulares y tricolporados, considerados como viables) y granos de polen vacíos (abortivos; Fig. 8B). El estilo es sólido en la base y en el ápice y se compone de epidermis, parénquima y tejido de transmisión (Figs. 8C).

La pared del ovario está formada por una epidermis externa, una epidermis interna y, entre ellas, varios estratos de células parenquimáticas. Dentro del ovario crecen un gran número de óvulos, los cuales culminan su desarrollo completo. Los óvulos son anátropos, uniitégmicos, con un corto funículo que los une a la placenta. El saco embrionario obedece a un desarrollo de tipo *Polygonum* y se encuentra rodeado por escasa nucela (Fig. 8D).



**Figura 7. Morfología floral de las plantas silvestres de *Nicotiana glauca*.** Morfo silvestre (A). Sépalos, tubo y pétalos de la corola (B). Corte longitudinal de la flor mostrando los principales tejidos del cáliz y la corola (C). Corte longitudinal de la flor mostrando el ovario (D). Tricomas en el envés del pétalo (E). Vista superficial del androceo y gineceo en el tubo de la corola (F). Filamentos y anteras (G). Estigma con papilas secretoras (H). Ovario con óvulos unidos a la placenta (I).

ab: abaxial; ad: adaxial; An, antera; Co: corola; T, tubo de la corola; Et, estigma; Fi, filamento; Ov, óvulo; Pa: pared del ovario; Pe, pétalo; Pl, placenta; Sbe: subepidermis; Tc, teca.

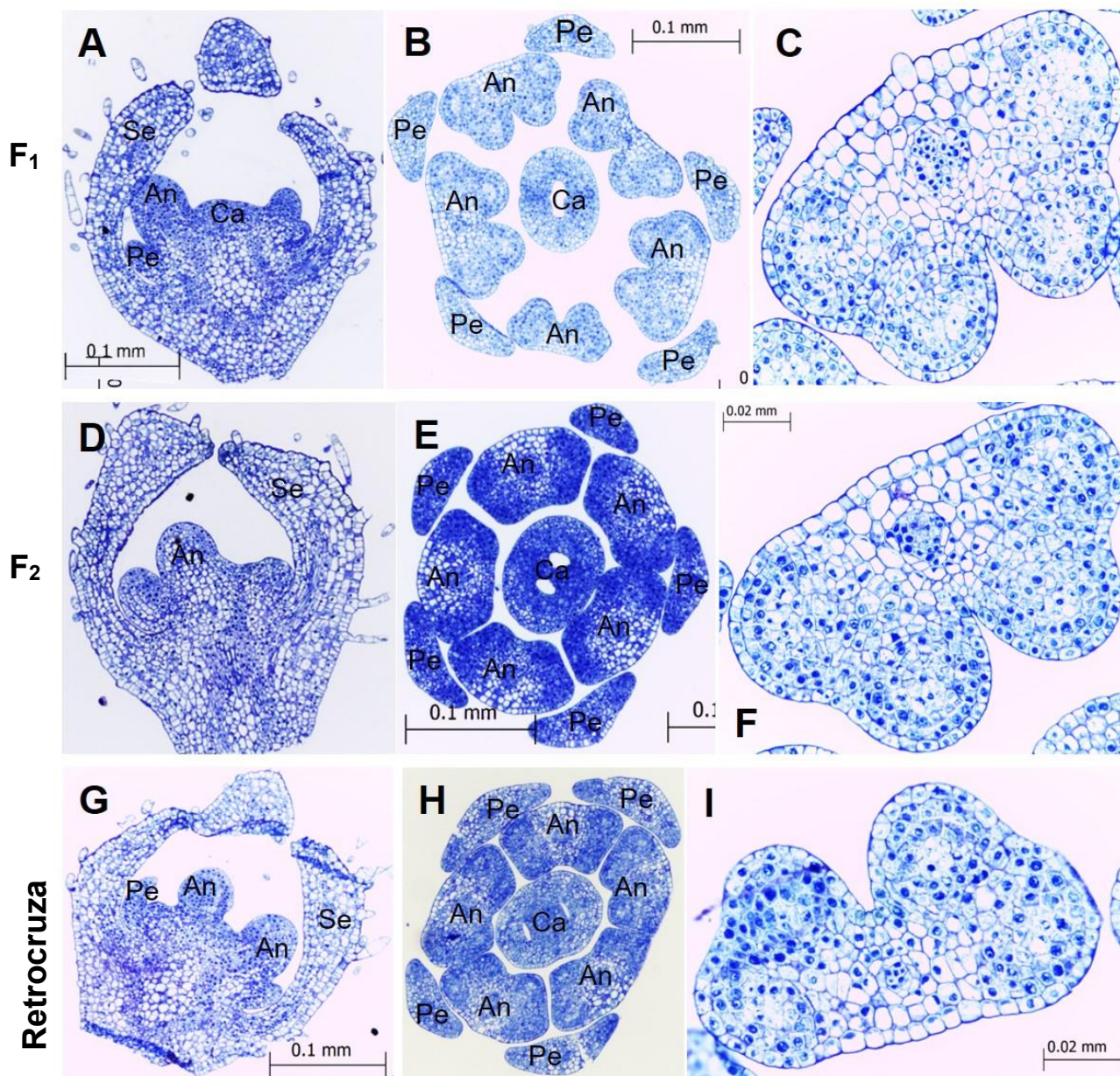


**Figura 8. Detalle de las anteras y el pistilo del morfo silvestre de *Nicotiana glauca*.** La pared de la antera compuesta de epidermis, endotecio, capa media y restos de tapete secretor (A). Granos de polen viables y abortivos (B). Corte longitudinal de una sección del estilo, el cual presenta epidermis, tejido de transmisión y parénquima. (C). Pared de ovario y óvulos anátropos, unitégmicos (D).

Cm, capa media; En, endotecio; Ep, epidermis; Fu, funículo; gpa, grano de polen abortivo; gpv, grano de polen viable; Ov, óvulo; Pa, parénquima; Pl, placenta; PO, pared del ovario; Tt, tejido de transmisión.

### 6.3. Desarrollo floral de las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y la retrocruza

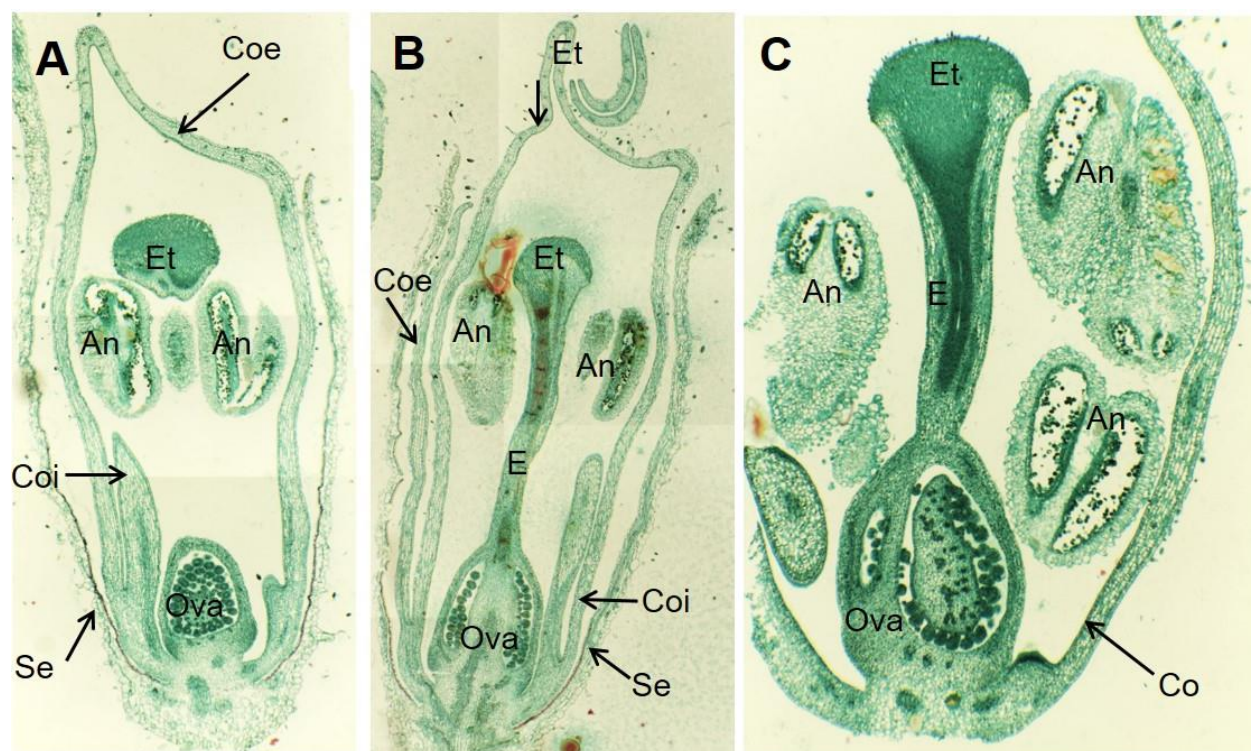
Las primeras etapas de desarrollo tanto de las flores F<sub>1</sub> (Figs. 9A-C), F<sub>2</sub> (Figs. 9D-F) y retrocruza (Figs. 9G-I), tienen un desarrollo normal y parecido a las flores WT en lo que respecta al cáliz, el gineceo y el androceo.



**Figura 9. Etapas de desarrollo de la flor de las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza.** Corte longitudinal de los primordios de sépalos, pétalos, antera y carpelo en la F<sub>1</sub> (A), F<sub>2</sub> (D) y retrocruza (G). Corte transversal de botón floral donde se encuentran los verticilos diferenciados en la F<sub>1</sub> (B), F<sub>2</sub> (E) y retrocruza (H). Corte transversal de antera mostrando los cuatro microsporangios en la F<sub>1</sub> (C), F<sub>2</sub> (F) y retrocruza (I). An, antera; Ca, carpelo; Pe, pétalo; PI, placenta; Se, sépalo.

Los cortes longitudinales (Fig. 9A, D y G) y transversales (Figs. 9 B, E y H) de las primeras etapas de desarrollo, muestran los primordios de sépalos, pétalos, estambres y carpelos, sin diferencias anatómicas evidentes.

Sin embargo, en todas las generaciones la corola presenta alteraciones desde las primeras etapas de desarrollo. Se observó que en la base de los pétalos y en posición abaxial, se presenta una bifurcación, esta alteración se desarrolla asincrónicamente en todos los pétalos, dando la impresión de una doble corola, sin embargo, se aleja del patrón descrito para la corola del morfo silvestre, por lo tanto, en adelante esta doble corola se compone de corola interna y externa. En las flores  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruza con doble corola, la corola interna puede o no presentar tricomas en la base de la epidermis adaxial, mientras que ambas corolas (interna y externa) presentan tricomas en la epidermis abaxial (Fig. 10).



**Figura 10. Alteraciones en la corola de las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruza.** Corte longitudinal de una flor con doble corola de la  $F_1$  (A). Corte longitudinal de una flor en preantesis que muestra la doble corola de la  $F_2$  (B). Corte longitudinal de una flor con morfo parecido a la WT de la retrocruza (C); An, antera; Coe, corola externa; Coi, corola interna; E, estilo; Et, estigma; Ova, ovario; Se, sépalo.



#### 6.4. Alteraciones morfológicas florales en la generación F<sub>1</sub>

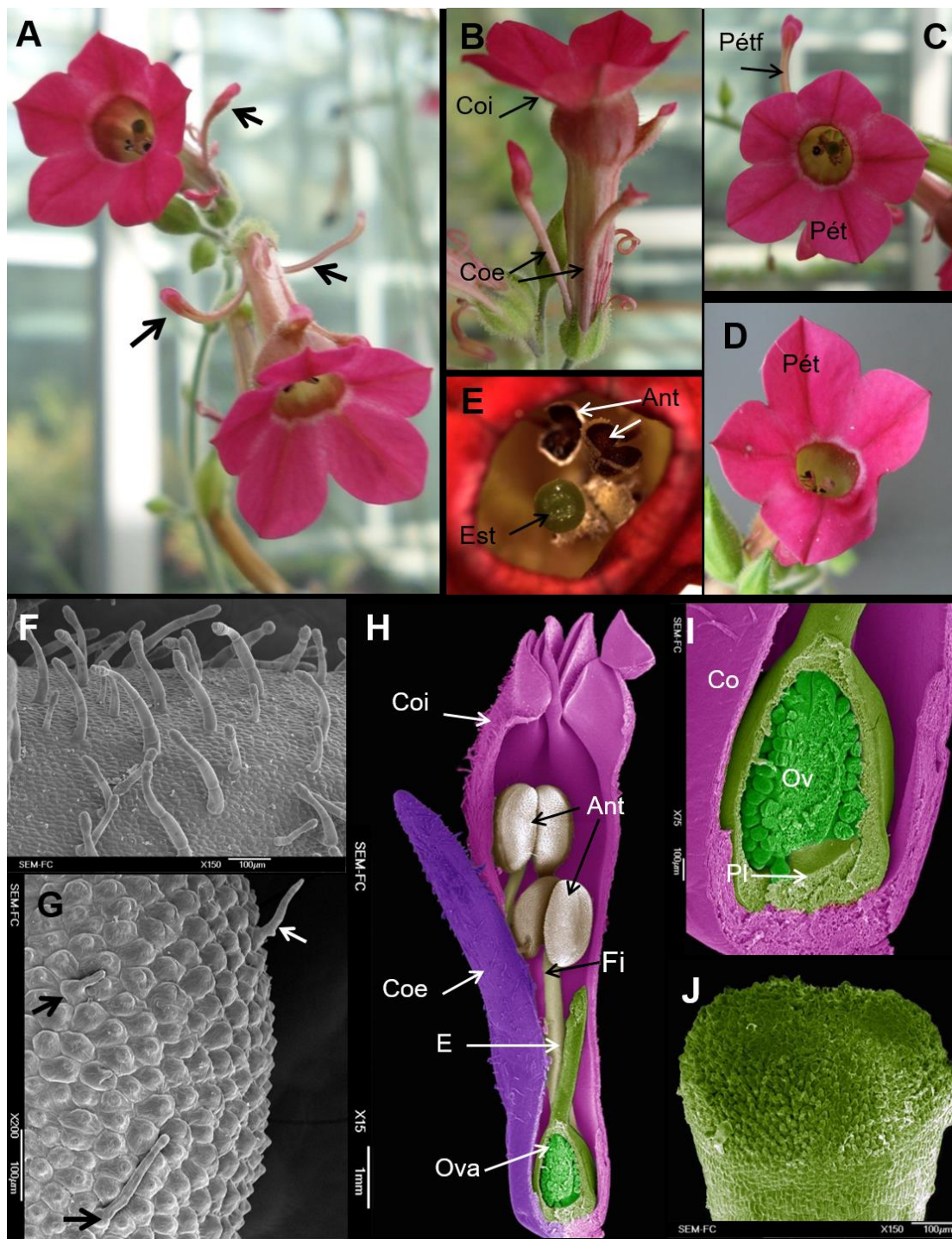
Las alteraciones morfológicas más evidentes detectadas en la generación F<sub>1</sub> son una corola parcialmente duplicada debido a una proliferación de tejido a partir de los pétalos en desarrollo formando pétalos extras que surgen de la base del verticilo inicial de la corola, pero son filamentosos, libres y más cortos que los pétalos que se encuentran fusionados y forman un tubo (Figs. 11A-C). Las anteras que producen una menor cantidad de granos de polen perceptible a simple vista (Fig. 11D).

La doble corola consta de un verticilo interno completo y similar al de la flor silvestre, es decir, presenta cinco pétalos, aunque algunas veces se distinguen cuatro (Fig. 11D), mide en promedio  $22.96 \pm 0.85$  mm de longitud. La corola externa está formada por unidades (pétalos) filamentosas e independientes, sin formar un segundo tubo floral (Figs. 11A y B), tales unidades varían en longitud y número (2 a 7; Fig. 11B). En antesis, ambas corolas presentan tricomas en el envés, tanto en el tubo floral como en la parte libre de cada pétalo (Fig. 11F y H). Asimismo, hay tricomas en la base de la cara adaxial.

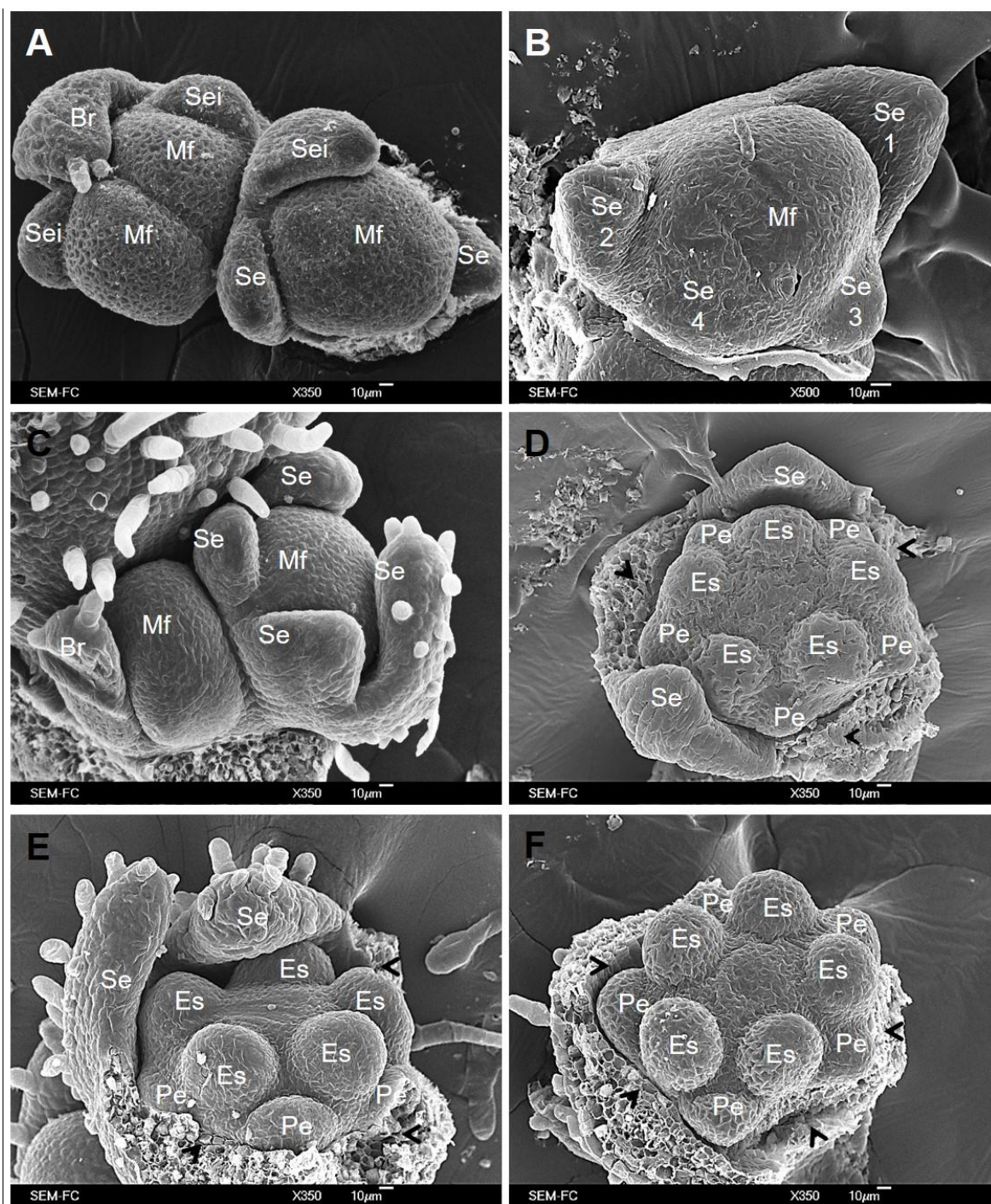
Con respecto al androceo el número de estambres es siempre cinco, como en el morfo silvestre, con una longitud similar ( $20.14 \pm 0.73$  mm). En las anteras se observa una menor producción de granos de polen (Fig. 11E y H). Una anomalía detectada fue la presencia de tricomas en algunas de las anteras (Fig. 11G).

El gineceo de la F<sub>1</sub> es parecido al de las flores WT, pero de menor tamaño ( $20.84 \pm 1.19$  mm) con respecto al de las silvestres, el estigma es húmedo y bilobular, de color verde en antesis y con papilas estigmáticas, mientras que el número de óvulos es similar (~ 328; Figs. 11H-J).

En las flores F<sub>1</sub> con corola duplicada el proceso de la ontogenia floral es similar a las flores silvestres, desde que el meristemo floral se encuentra cubierto por una bráctea y comienza con el desarrollo del primer verticilo (cáliz) hasta la etapa donde se inicia la formación de dos primordios carpelares ubicados en el centro del botón floral (Figs. 12A-F y 13A y B).



**Figura 11. Alteraciones morfológicas en la F<sub>1</sub>.** Flores M-SR1SX con corola duplicada y anteras que producen menor cantidad de polen (A-E). Acercamiento a la epidermis abaxial de la corola (F). Antera con tricomas (flechas, G). Flor en antesis con doble corola, estambres y ovario súpero (H). Ovario con numerosos óvulos unidos a la placenta (I). Estigma con papilas secretoras (J). An, antera; Coe, corola externa; Coi, corola interna; E, estilo; Et, estigma; Fi, filamento, Ova, ovario; Ov, óvulo; Pe, pétalo; Pef, pétalo filamentos; Pl, placenta.



**Figura 12. Morfología del desarrollo de flores  $F_1$  de *Nicotiana rastroensis*.** Ápice de la inflorescencia mostrando tres botones florales (A). Botón floral en el que se ha iniciado la diferenciación de los sépalos (B). Engrosamiento y curvamiento de los sépalos (C). Cáliz pentámero, cinco primordios de estambres y cinco primordios de pétalos (D). Cinco estambres en desarrollo y sépalos con tricomas (E). Botón floral con pétalos, y cinco estambres (F).

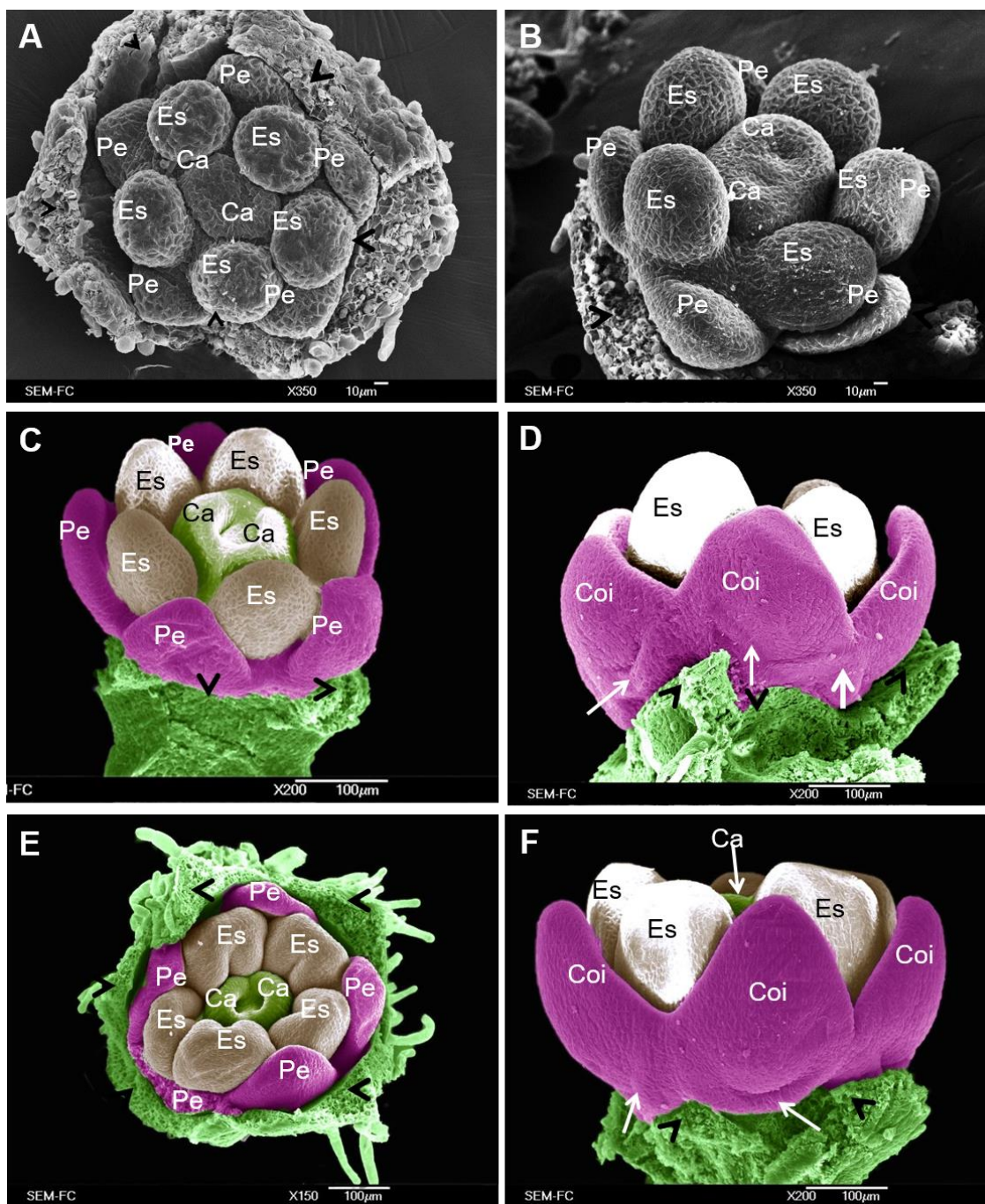
Br: bráctea; Ca: carpelo; Es: estambre; Mf: meristemo floral; Pe: pétalo; Se: sépalo. Cabeza de flecha = sépalos removidos.

En la etapa donde los dos primordios carpelares se han diferenciado, comienzan a adquirir una forma cilíndrica y una hendidura se hace evidente, los primordios de estambres comienzan a alargarse y a ensancharse para formar las estructuras correspondientes a los lóbulos de la antera (Fig. 13C). Es en esta etapa cuando en la base de la cara abaxial de los pétalos comienzan a formarse unas protuberancias laterales y alternas a cada pétalo (flechas blancas; Fig. 13D). En la etapa en que cada estambre se empieza a alargar para formar el filamento, las anteras comienzan a verse tetrasporangias (Fig. 13E), los pétalos comienzan a alargarse y las protuberancias laterales se hacen más evidentes (Fig. 13F). Al finalizar esta etapa se observan tricomas en la cara abaxial (Figs. 14A y B), la hendidura se va cerrando.

Una vez que los carpelos se han fusionado y alargado, se comienza a formar el gineceo como en las flores silvestres (Figs. 14C y E). En esta misma etapa, las protuberancias laterales se comienzan a engrosar y alargar, formando la corola externa o doble corola (flechas blancas), pero entre éstos siguen surgiendo más protuberancias (cabezas de flecha) en la parte basal de los pétalos, alternas a la corola interna (Figs. 14D y F).

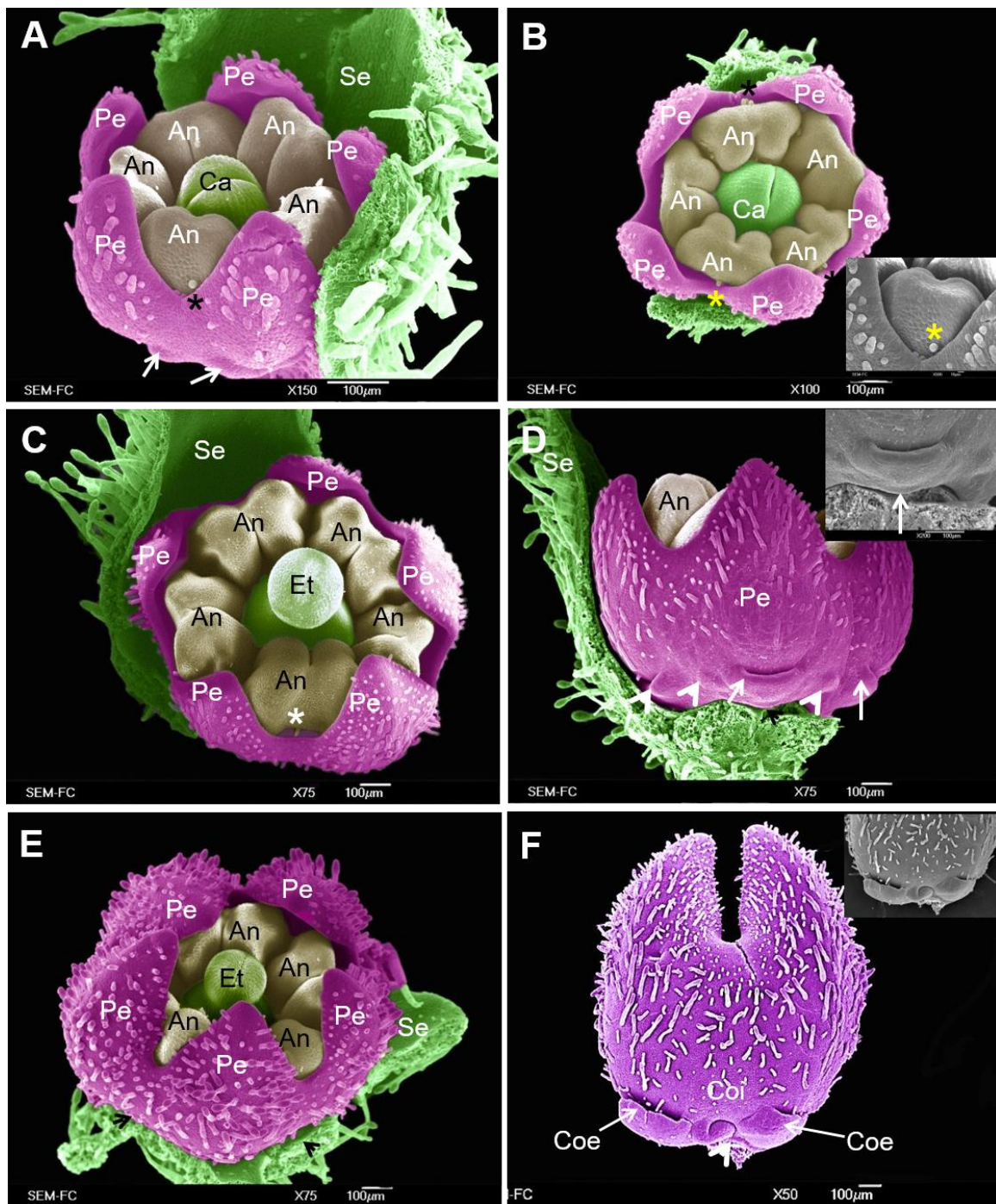
En la siguiente etapa, el gineceo continúa su desarrollo como en las flores silvestres. Las anteras son bitecas, con línea de dehiscencia longitudinal más evidente que en el mofo silvestre y los filamentos comienzan a ser de diferentes tamaños (Figs. 15A y B). El cáliz tiene un crecimiento mayor, con respecto al resto de los verticilos y en la etapa media del desarrollo de la flor deja de crecer. Lo mismo sucede en un principio con la corola interna y se empieza a convertir en un tubo que cesará su crecimiento antes de la antesis de la flor. Tanto el cáliz y la corola presentan tricomas en la cara abaxial, siendo más abundantes y largos en el cáliz (Figs. 15C y D).

Las protuberancias laterales se elongan y se fusionan parcialmente con la corola interna, mientras que las protuberancias laterales secundarias, en un principio, están dobladas y al desarrollarse se elongan o se enrollan sobre sí mismas (Figs. 15B-D).



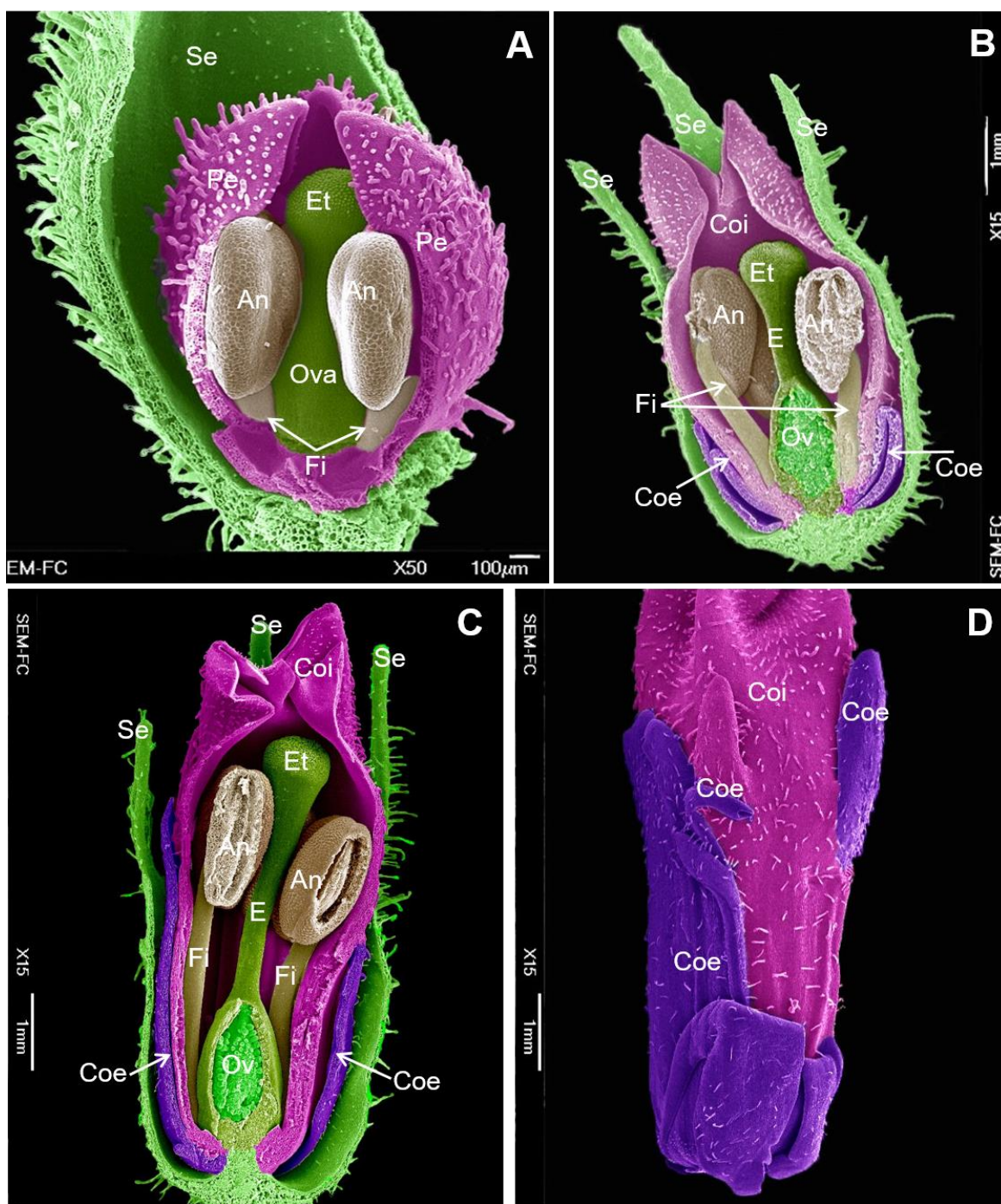
**Figura 13. Morfología de las flores F<sub>1</sub> en etapas más avanzadas.** Botón floral con cinco pétalos, cinco estambres y en el centro se aprecia el surgimiento de dos primordios de carpelo (A). Los dos primordios de carpelo se encuentran diferenciados y se nota una ligera hendidura (B). Botón floral con cinco pétalos, cinco estambres alargados y dos carpelos con una hendidura (C). En la parte basal de los pétalos comienzan a formarse unas protuberancias laterales (flechas blancas; D). Los pétalos se comienzan a alargar, las anteras son tetrasporangiadas y los dos carpelos con una hendidura más pronunciada (E). Las protuberancias en la base de los pétalos son más pronunciadas (F).

Br: bráctea; Ca: carpelo; Coi: corola interna; Es: estambre; Mf: meristemo floral; Pe: pétalo; Se: sépalo. Cabeza de flecha = sépalos removidos.



**Figura 14. Morfología las de flores  $F_1$  en etapas más avanzadas.** Presencia de sépalos, pétalos (ambos con tricomas en la cara abaxial), cinco estambres (algunos con tricomas, asterisco) y carpelos en desarrollo (A y B). El gineceo comienza a diferenciarse (C). Pétalo con tricomas en el envés y en la base se comienzan a formar las protuberancias laterales (cabezas de flechas, D). Una vez que se diferencian el androceo y el gineceo, se comienzan a fusionar los estambres (E). Las protuberancias laterales se comienzan a engrosar y alargarse para formar los pétalos externos y entre estos siguen surgiendo más protuberancias (cabezas de flecha) en la parte basal de los pétalos (F).

An, antera; C, carpelo; Coi: corola interna; Coe: corola externa; Et, estigma; Pe: pétalo; Se: sépalo.



**Figura 15. Morfología las de flores F<sub>1</sub> en etapas más avanzadas.** Botón floral donde se diferencian los estambres con sus filamentos y anteras; el pistilo con estigma, un estilo corto y ovario y la cara abaxial de pétalos y sépalos presenta tricomas (A). Los pétalos internos alargados y los internos se encuentran doblados sobre sí mismos (B). Los pétalos externos e internos alargados, ambos presentan tricomas en su cara abaxial (C). Tanto los pétalos internos y los externos presentan tricomas en la cara abaxial, siendo más abundantes y largos en los primeros (D).

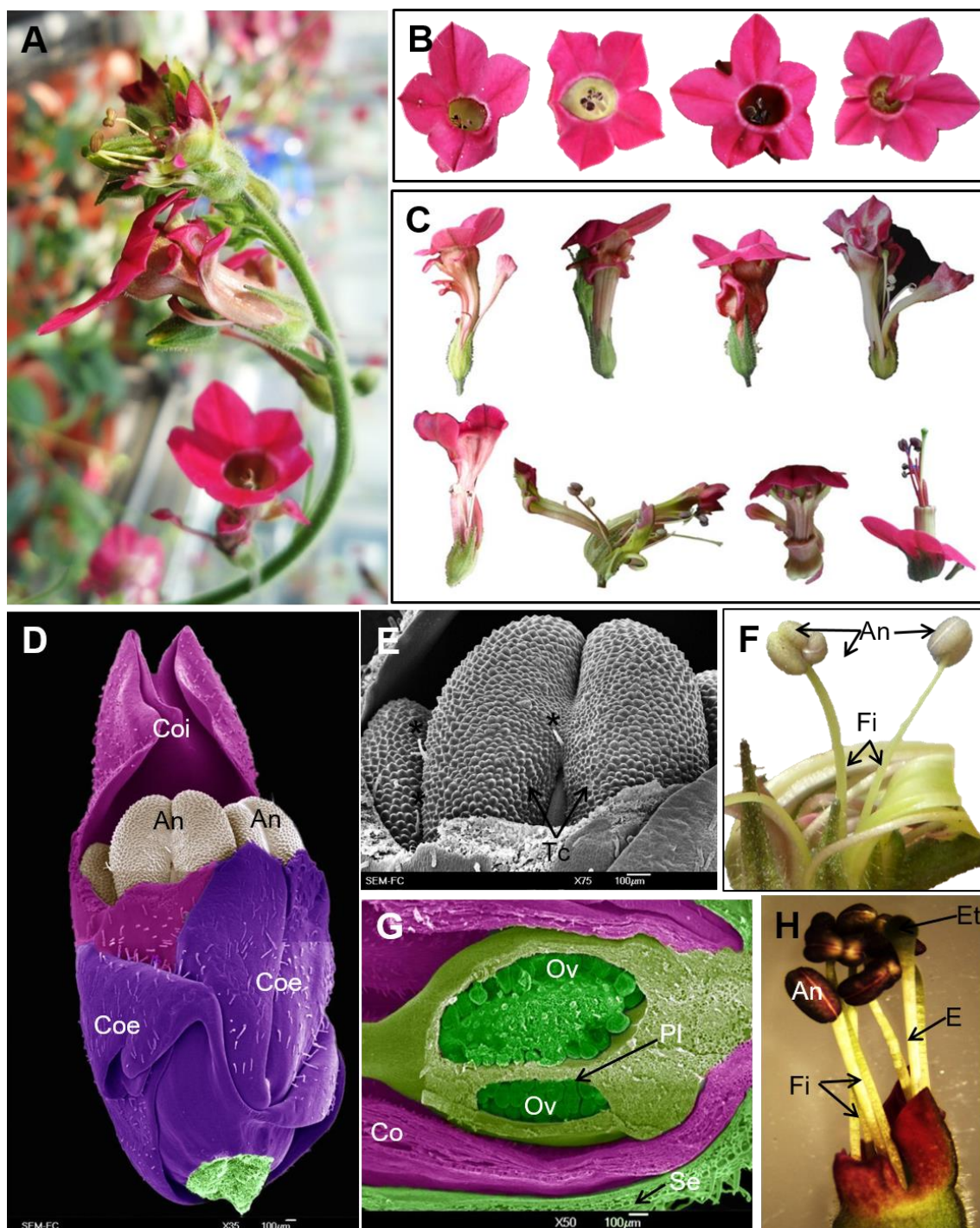
An, antera; Coe: corola externa; Coi: corola interna; E, estilo; Et, estigma; Fi, filamento; Ova, ovario, Ov, óvulos; Pe: pétalo; Se: sépalo.

### **6.5. Alteraciones morfológicas florales en los individuos de la generación F<sub>2</sub>**

Se obtuvieron 40 plantas que corresponden a la F<sub>2</sub>, de las cuales 22 plantas presentaron una corola normal como en el morfo silvestre y 18 tuvieron doble corola, en este segundo grupo se observaron más alteraciones (Figs. 16A-C).

En las flores con doble corola, la corola interna es similar al de las flores WT, sin embargo, en ocasiones esta corola no se cierra por completo y tiene una longitud más corta ( $17.4 \pm 1.195$  mm) que WT y F<sub>1</sub>, se compone de cuatro a seis pétalos (Fig. 16B). La corola externa tiene mucha más variación en la forma, número y longitud de los pétalos que la conforman, pueden ser filamentosos, unos más anchos que otros, pueden estar separados o fusionados, formando un tubo similar a la corola interna (Fig. 16C). En ambas corolas se presentan tricomas en el envés, tanto en el tubo floral como en la parte libre de cada pétalo, pero varían en la cantidad (Figs. 16D). El androceo de las flores con doble corola se forma de cuatro a seis estambres, que varían en longitud ( $16.7 \pm 0.87$  mm), la mayoría de las anteras presentan tricomas en su pared y se observaron hasta dos anteras sobre un solo filamento (Figs. 16E y F). El gineceo de la F<sub>2</sub> es similar al de las flores WT y F<sub>1</sub>, excepto por la longitud del pistilo, que sobrepasa los estambres, inclusive llega a sobresalir de la corola (Figs. 16G y H).





**Figura 16. Morfología las de flores F<sub>2</sub> de *Nicotiana rastroensis*.** Flores con corola duplicada (A). Vista superior de la corola compuesta de 4-6 pétalos (B). Vista lateral de flores en antesis donde se muestran las variedades en la doble corola (C). Flor con doble corola, es decir, presenta corola interna y externa; ambas presentan trimomas (D). Antera con tricomas (\*; E). Dos anteras sobre un filamento (F). Ovario con numerosos óvulos unidos a la placenta (G). Pistilo y estambres que sobresalen de la corola (H).

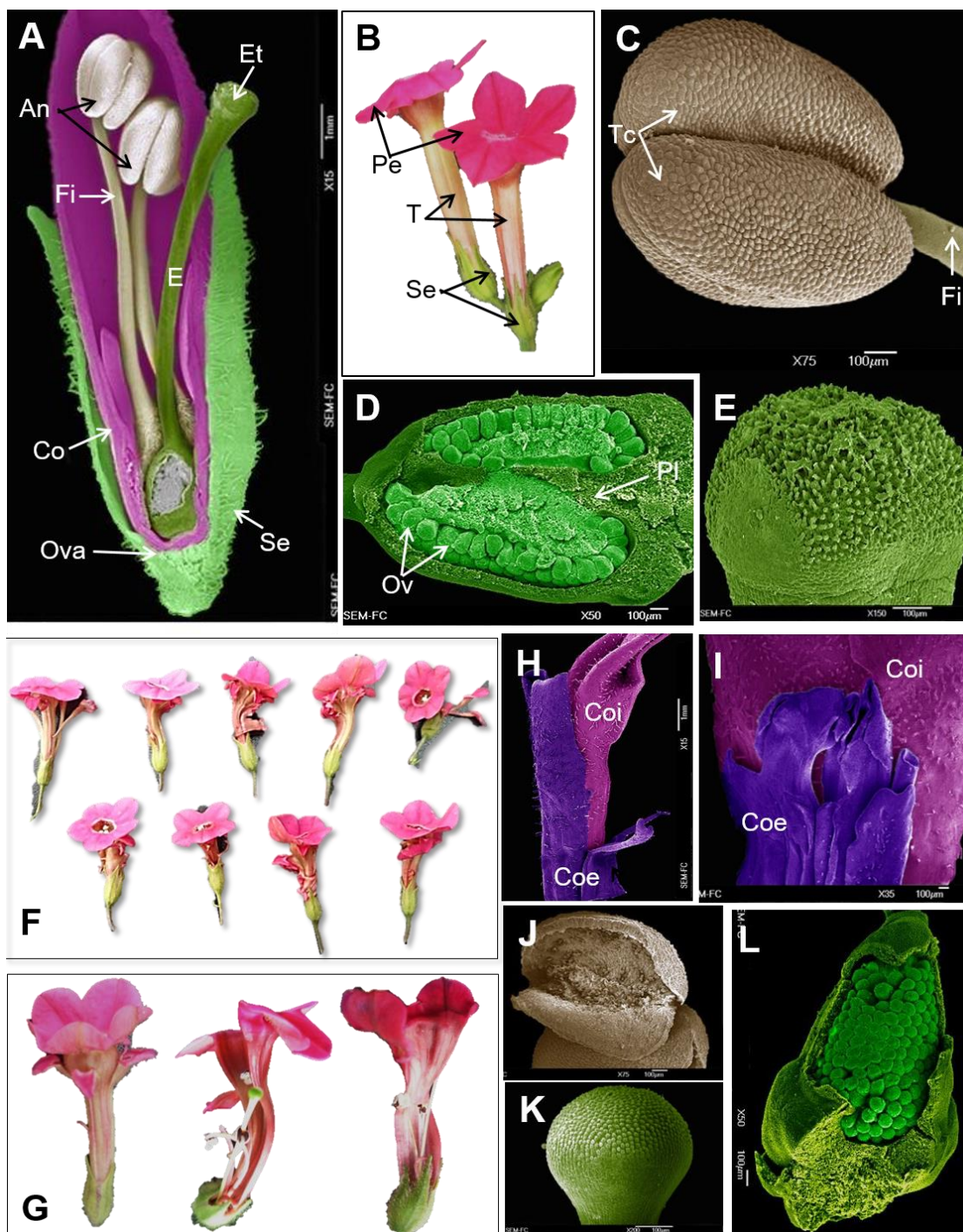
An, antera; Co, corola; Coe, corola externa; Coi, corola interna; E, estilo; Et, estigma, Fi, filamento; Ov, óvulos; Pl, placenta; Tc, teca; \* = tricomas.

## 6.6. Alteraciones morfológicas florales en los individuos producto de la retrocruza de WT x F<sub>1</sub>

Se obtuvieron 60 plantas, de las cuales 44 presentaron dole corola y 16 tuvieron una corola normal.

En esta línea retrocruzada también se obtuvieron dos tipos de flores, unas semejantes a las WT en cuanto a sépalos, pétalos (formando una sola corola), estambres y pistilo (Figs. 17A-E). Dentro de las alteraciones morfológicas se obtuvieron flores con doble corola tubular (Fig. 17F) y no tubular (Fig. 17G). La corola interna también presenta tricomas en el envés, en las flores con doble corola tubular la longitud promedio de la corola interna es de  $20.87 \pm 0.34$  mm, mientras que en las no tubulares es de  $32.1 \pm 0.16$  mm. Se observó que en algunos casos la fusión del tubo es incompleta exponiendo los órganos sexuales inclusive desde el receptáculo (Fig. 17F). La longitud de la corola externa es poco conspicua ya que los pétalos se encuentran plegados o enrollados; las corolas externas presentan tricomas en el envés, pero estos no mostraron un patrón de densidad o número (Figs. 17H e I). En el androceo de estas retrocruzas se forman cuatro o cinco estambres, en algunos casos las anteras están casi vacías (Fig. 17J); en la pseduo corola tubular los estambres son más cortos que en el morfo silvestre ( $17.09 \pm 0.31$  mm) y en la doble corola no tubular son muy similares ( $19.56 \pm 0.3$  mm).

El gineceo es parecido al de las flores WT (Figs. 17K y L), solo varían en el tamaño del pistilo, teniendo el estigma una altura variable con respecto a los estambres, quedando muy por debajo, a la misma altura o por arriba de éstos, e incluso puede sobresalir de la corola.



**Figura 17. Morfología de la retrocruza (WT x F<sub>1</sub>) de *Nicotiana glauca*.** Flores con una corola semejantes a la WT en cuanto a sépalos, pétalos, androceo y gineceo (A-E). Flores con una corola duplicada (F). Corolas internas y externas con alteraciones morfológicas (G). Corola interna y externa con tricomas (H). Corola externa sin tricomas (I). Antera abierta con pocos granos de polen (J). Estigma con papilas secretoras (K). Ovario con numerosos óvulos unidos a la placenta (L).

An, antera; Co, corola; Coe, corola externa; Coi, corola interna; E, estilo; Et, estigma; Fi, filamento, Ova, ovario; Ov, óvulo; Pe, pétalo; Pl, placenta.

## 6.7. Efecto en la fertilidad masculina.

### 6.7.1. Cantidad de granos de polen por flor

La cantidad de granos de polen disminuye significativamente a medida que se pierde la variabilidad genética ( $K-W = 75.41$ ,  $P = 0.0001$ ), mientras que la planta madre produce en promedio  $696.8 \pm 12.36$  granos de polen, la  $F_1$  produjo de  $255.03 \pm 2.33$  y la  $F_2$   $230.33 \pm 1.56$  granos. Al hacer la retrocruza de WT con la  $F_1$  también se encontró que el número de granos de polen disminuye significativamente, sin embargo, el efecto no es tan fuerte ( $K-W = 43.30$ ,  $P = 0.0001$ ) como en el caso anterior, lo que hace suponer que la variabilidad genética de la progenie de la  $F_1$  se recupera en cierto grado, al fecundarse con la planta madre (WT). Cuando se utilizan flores de corola normal para la retrocruza, la pérdida de granos de polen es mayor, que cuando se utilizan flores de doble corola ( $491.26 \pm 4.52$  y  $573.06 \pm 6.04$  respectivamente).

La disminución en la cantidad de granos de polen es una consecuencia de la endogamia. El modelo lineal (Fig. 18A) predice que por cada F que se va obteniendo, se van produciendo 233 granos de polen menos por cada generación, siendo esta correlación significativa ( $r^2 = 0.7896$ ).

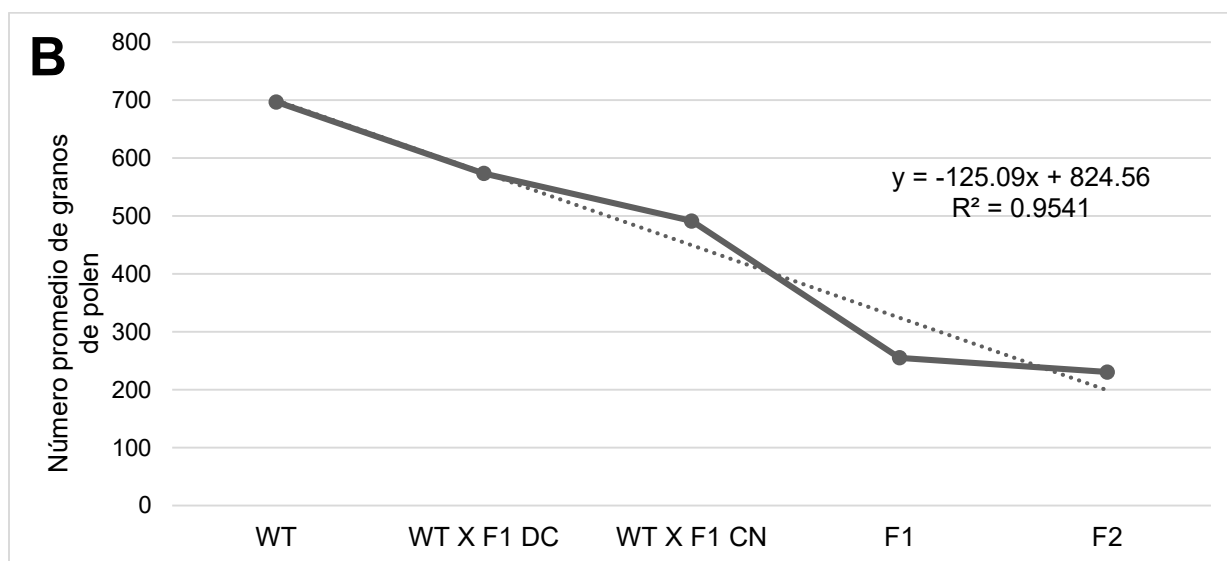
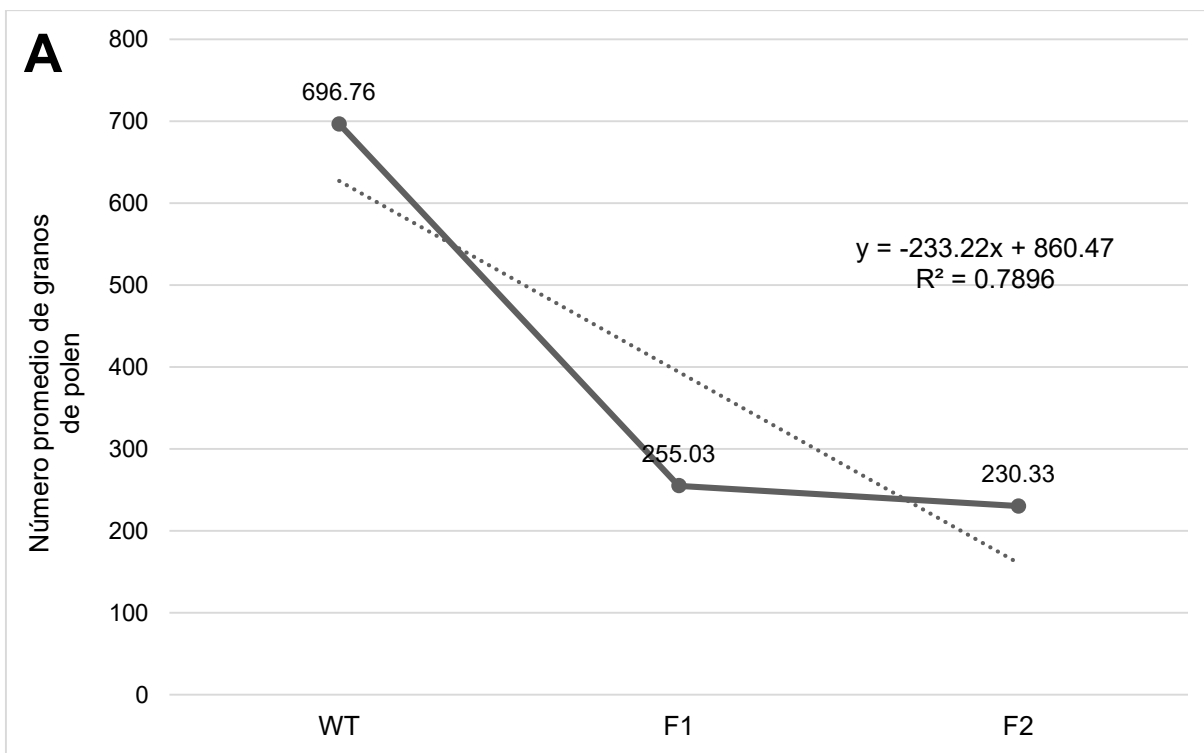
Sin embargo, si se consideran las retrocruzas, el modelo lineal (Fig. 18B) predice que la disminución en la cantidad de granos de polen es de 125 por cada progenie ( $r^2 = 0.9541$ ).

### 7.7.2 Viabilidad de granos de polen

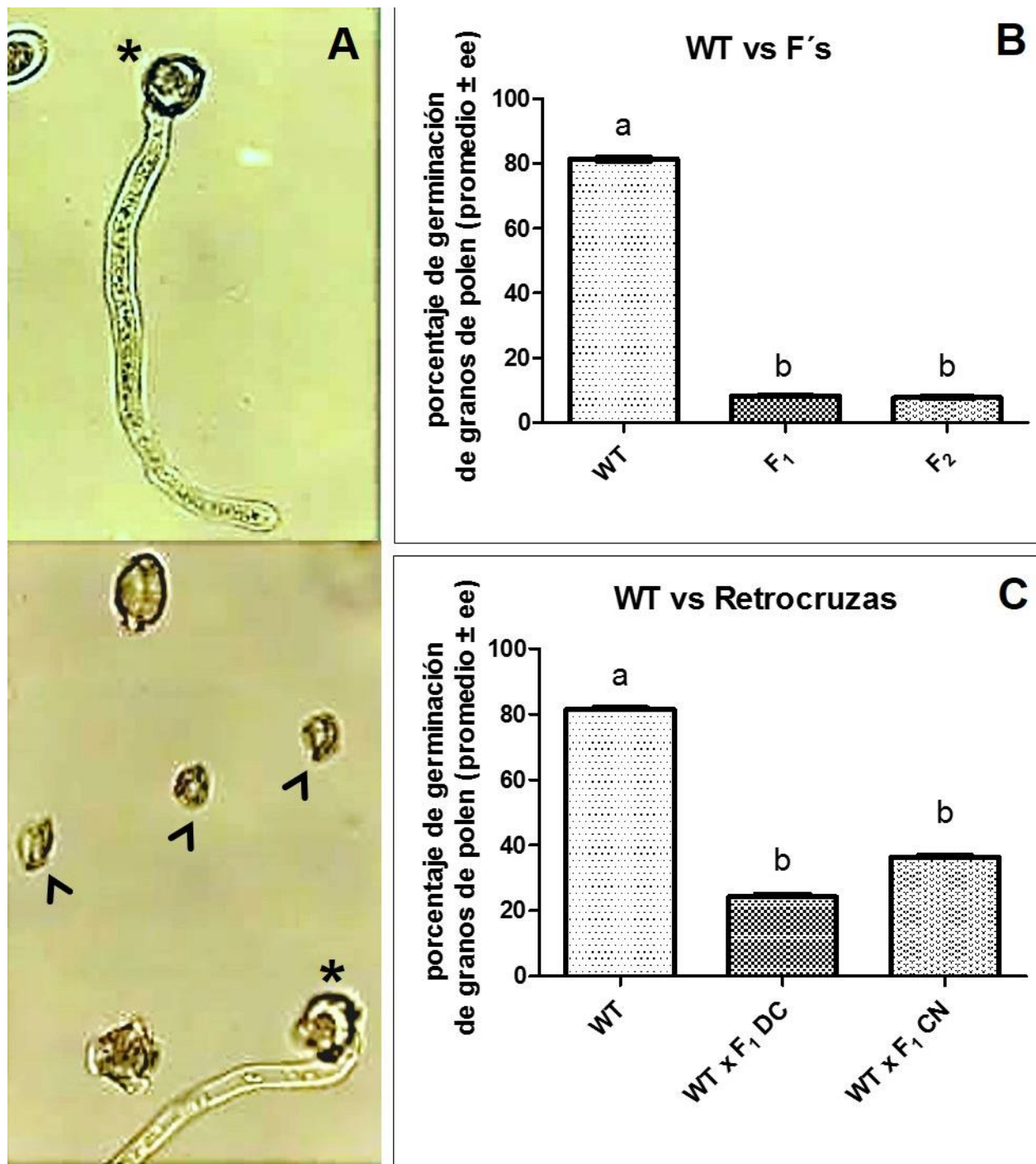
Conforme se va disminuyendo la variabilidad genética, la cantidad de granos de polen que germinaron (Fig. 19A) disminuyó significativamente ( $K-W = 61.08$ ,  $P < 0.0001$ ). El porcentaje de germinación de granos de polen para las flores silvestres (WT) fue de  $81.42 \pm 0.64$ , para las flores de la generación  $F_1$  fue de  $8.2 \pm 0.24$  y para la  $F_2$  fue de  $7.76 \pm 0.29$  (Fig. 19B).

La germinación de granos de polen en la retrocruza de doble corola fue menor que en las flores con corola normal ( $24.13 \pm 0.67\%$  y  $36.33 \pm 0.37\%$  respectivamente), sin

embargo, en ambos casos, éstos resultados fueron diferentes del porcentaje obtenido en las flores silvestres (K-W = 50.13, P = 0.0001, Fig. 19C).



**Figura 18. Disminución de granos de polen.** A. Disminución de granos de polen en F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>. B. Disminución de granos de polen considerando las retrocruzas.



**Figura 19. Germinación de granos de polen.** A. Granos de polen viable (\*) y no viables (cabezas de flecha). B. Promedio de granos de polen germinados en las flores WT, F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>. C. Promedio de granos de polen germinados en flores WT y retrocruzas.

## **6.8. Efecto en la fertilidad femenina.**

### **6.8.1. Cantidad de óvulos por flor**

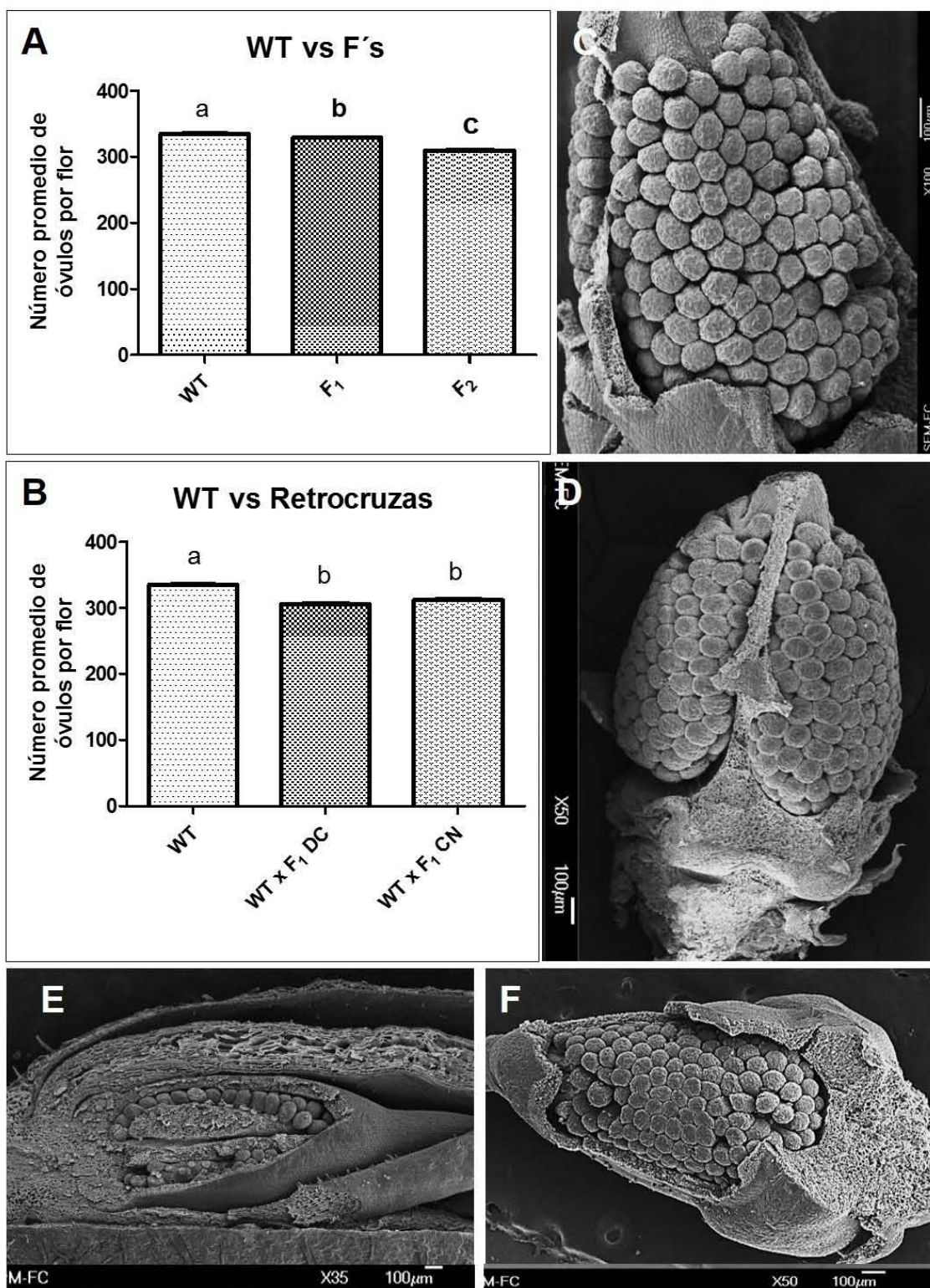
La cantidad de óvulos disminuye significativamente por cada generación que se produce (K-W = 69.66, P = 0.0001). El promedio de óvulos de las flores silvestres (WT) fue de  $334.9 \pm 3.857$ , para las flores de la generación F<sub>1</sub> fue  $328.1 \pm 3.610$  y para las flores de la F<sub>2</sub> fue de  $309.9 \pm 6.957$ . Para el caso de las retrocruzas, WT con F<sub>1</sub>, también hay una disminución significativa en la cantidad de óvulos (K-W = 63.21, P = 0.0001); el promedio de óvulos para la retrocruza con corola normal fue de  $311.9 \pm 7.810$  y para la retrocruza con doble corola fue de  $305.7 \pm 7.296$  (Figs. 20A-B) y, por lo tanto, la pérdida de óvulos es más grande entre la cruce de WT y la F<sub>1</sub> que presenta doble corola en comparación con la retrocruza con corola normal.

### **6.8.2. Germinación de semillas**

El porcentaje promedio de semillas que germinaron para las flores WT fue de  $46.52 \pm 6.679$ , para la F<sub>1</sub> fue de  $38.38 \pm 12.02$ , para la F<sub>2</sub> fue de  $31.15 \pm 9.771$  y para la retrocruza  $39.89 \pm 14.25$ . La prueba estadística mostró que la germinación es significativamente menor en las semillas de la F<sub>2</sub> (K-W = 11.48, P = 0.0032; Fig. 21). Al evaluar la germinación de la retrocruza y el morfo silvestre también se encontraron diferencias, aunque el valor de significancia fue más bajo que en el caso anterior (U=44.50, P= 0.0423). Es decir, en un gradiente de pérdida de variabilidad genética, la viabilidad en las semillas fue el factor menos afectado en comparación con los arriba evaluados.

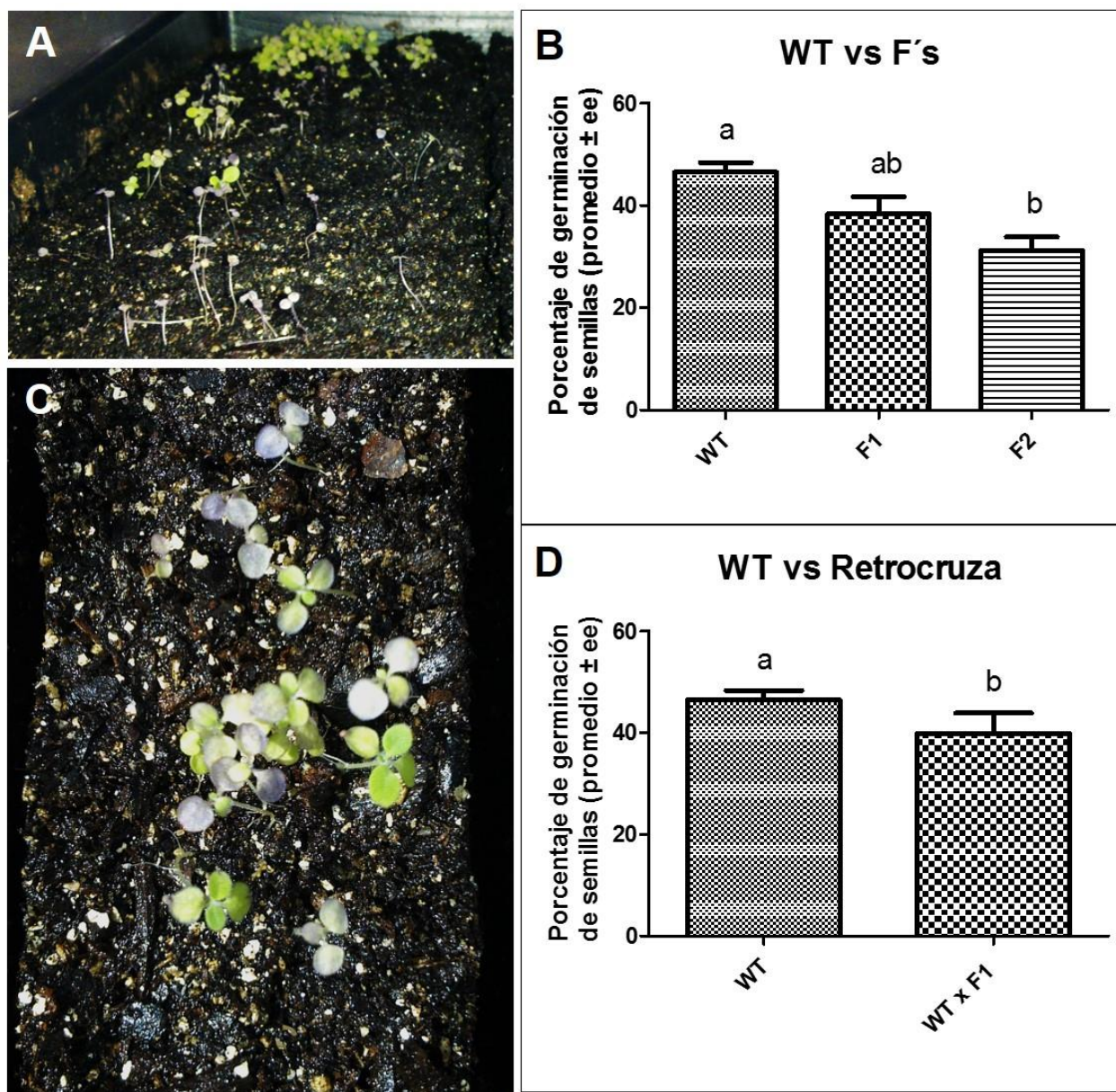
## **6.9. Hercogamia**

Las corolas del morfo WT presentaron una longitud promedio  $23.262 \pm 0.0685$  mm, mientras que la longitud promedio del pistilo y los estambres del morfo WT fue de  $22.46 \pm 0.130$  mm y  $20.610 \pm 0.138$  mm respectivamente. La prueba estadística mostró que hay diferencia significativa entre las longitudes de dichas estructuras y que su variación es mínima (K - W = 25.81, P < 0.0001; Fig. 22A). Lo anterior indica que las flores presentan



**Figura 20. Número de óvulos por ovario.** A. Cantidad de óvulos en las flores WT vs F<sub>s</sub> (A). Promedio de número de óvulos en flores WT vs las retrocruzas con doble corola (DC) y corla normal (CN; B). Óvulos de flores WT, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza con corla normal respectivamente (C-F).





**Figura 21. Germinación de semillas.** A y B. Porcentaje de semillas germinadas de las plantas WT, F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>. C y D. Porcentaje de germinación de semillas en la retrocruza.

una hercogamia de aproximación, en donde el pistilo tiene una longitud superior a la de los estambres, pero ambos quedan excedidos por la corola.

Las corolas, el pistilo y los estambres de la generación F<sub>1</sub> tuvieron una longitud promedio de  $22.966 \pm 0.850$  mm,  $20.843 \pm 1.196$  mm y  $20.1472 \pm 0.729$  mm

respectivamente, es decir, las longitudes disminuyen en comparación con el morfo WT. La longitud de dichas estructuras mostró gran variación (corola por arriba de pistilo y estambres, estambres al mismo nivel del pistilo, estambres por arriba del pistilo, corola al mismo nivel del pistilo, el pistilo rebasaba la corola, etc.) y por lo tanto la hercogamia se perdió en esta generación (K-W = 4.408, P = 0.1104; Fig. 22B).

La longitud promedio de las corolas de la F<sub>2</sub> fue de 17.407 ± 1.195 mm mientras que la del pistilo y los estambres fue de 15.894 ± 1.194 mm y 16.7068 ± 0.870 mm respectivamente. La prueba estadística muestra que no hay diferencia significativa entre las longitudes de cada estructura (K-W = 1.280, P = 0.5273; Fig. 22C), sin embargo, todas disminuyeron de tamaño y se observa una tendencia a invertir la hercogamia, es decir, los estambres son más largos que el pistilo.

La hercogamia (considerada como la diferencia que existe entre la longitud del pistilo y del androceo), en el morfo WT, es significativamente diferente de la hercogamia en la F<sub>2</sub>, la cual incluso se puede considerar como hercogamia inversa (KW= 13.41; P = 0.0094; Fig. 22).

Para el caso de las retrocruzas, WT con F<sub>1</sub>, se observa el cambio que existe entre el morfo WT y la F<sub>1</sub>. En la retrocruza no tubular la corola sigue siendo más alta (23.1 ± 0.163 mm) que el pistilo (20.863 ± 0.248 mm) y androceo (19.56 ± 0.303 mm), pero pistilo y androceo ya no muestran diferencia de longitud (K-W = 22.80, P < 0.0001; Fig. 22D).

En la retrocruza tubular, la corola (20.871 ± 0.344 mm) no presenta diferencias con respecto al pistilo (19.137 ± 0.538 mm), pero si es significativamente diferente de la altura del androceo (17.091 ± 0.318 mm), además de que no hay diferencias entre gineceo y androceo, como sucede en la otra retrocruza (K-W = 18.87, P < 0.0001; Fig. 22E). En ambos casos al comparar las retrocruzas con la hercogamia del morfo silvestre (Fig. 23) no se encontraron diferencias significativas, pero si se observan fuertes variaciones en dicha medida.

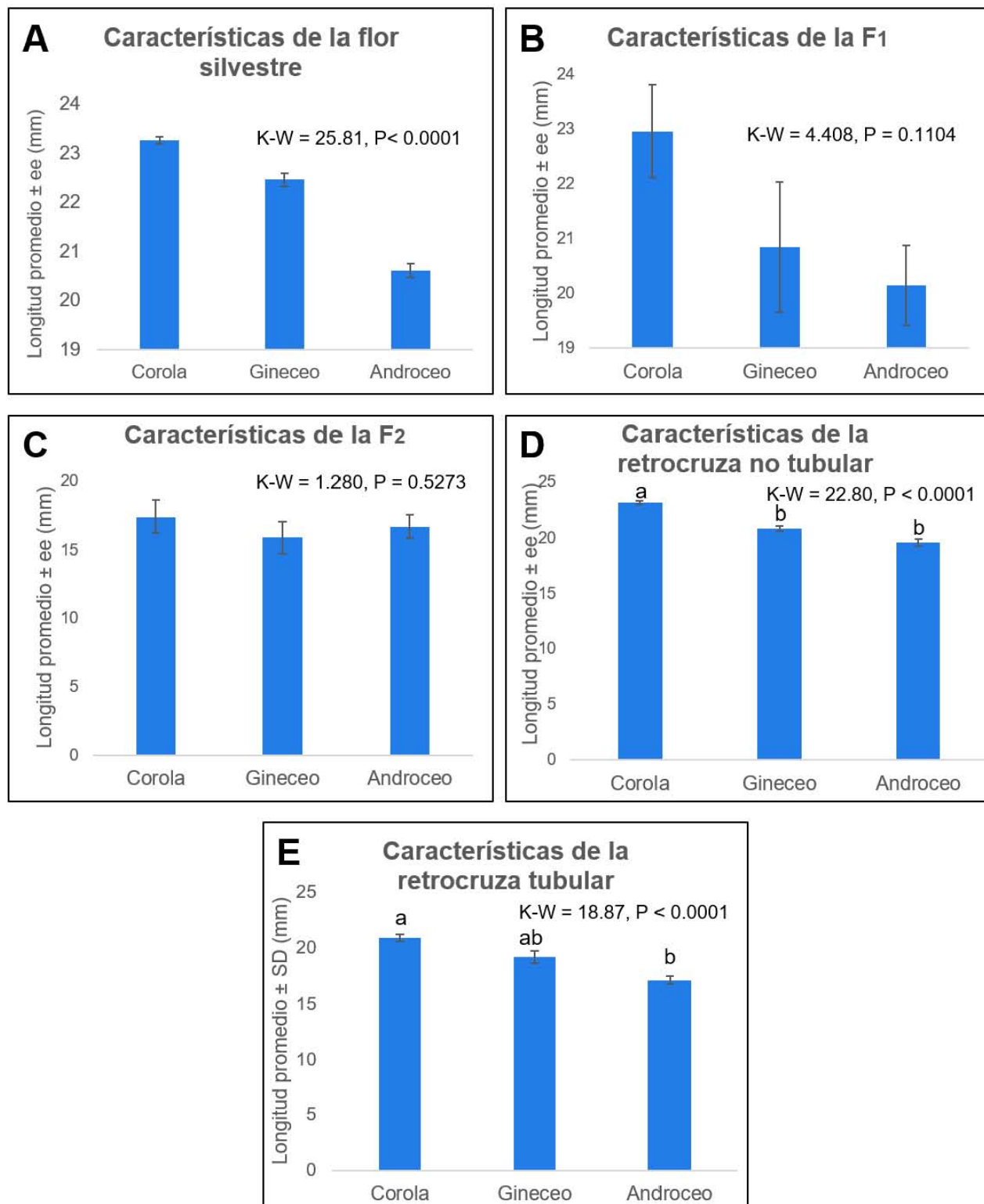
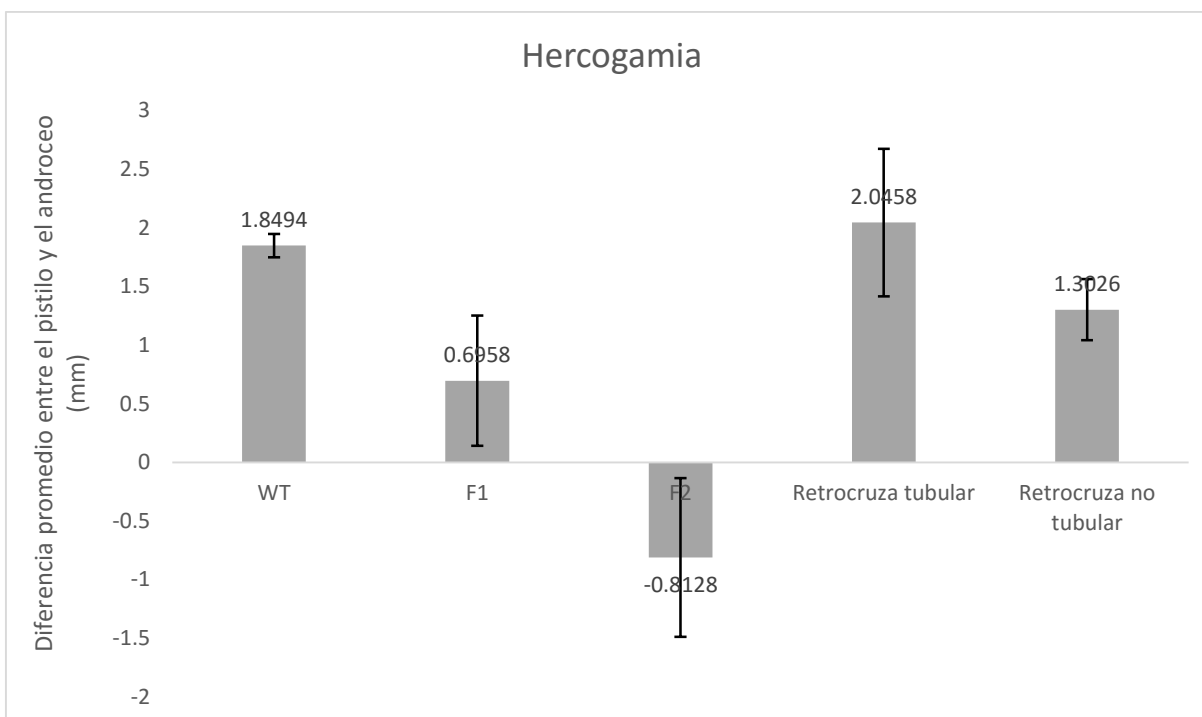


Figura 22. Longitud de la corola, el gineceo y el androceo de las diferentes generaciones de *Nicotiana glauca* obtenidas por autopolinización.



**Figura 23. Hercogamia en *Nicotiana rastroensis*.** Se muestran los valores de separación (en mm) entre la longitud del pistilo y los estambres, para cada generación obtenida.

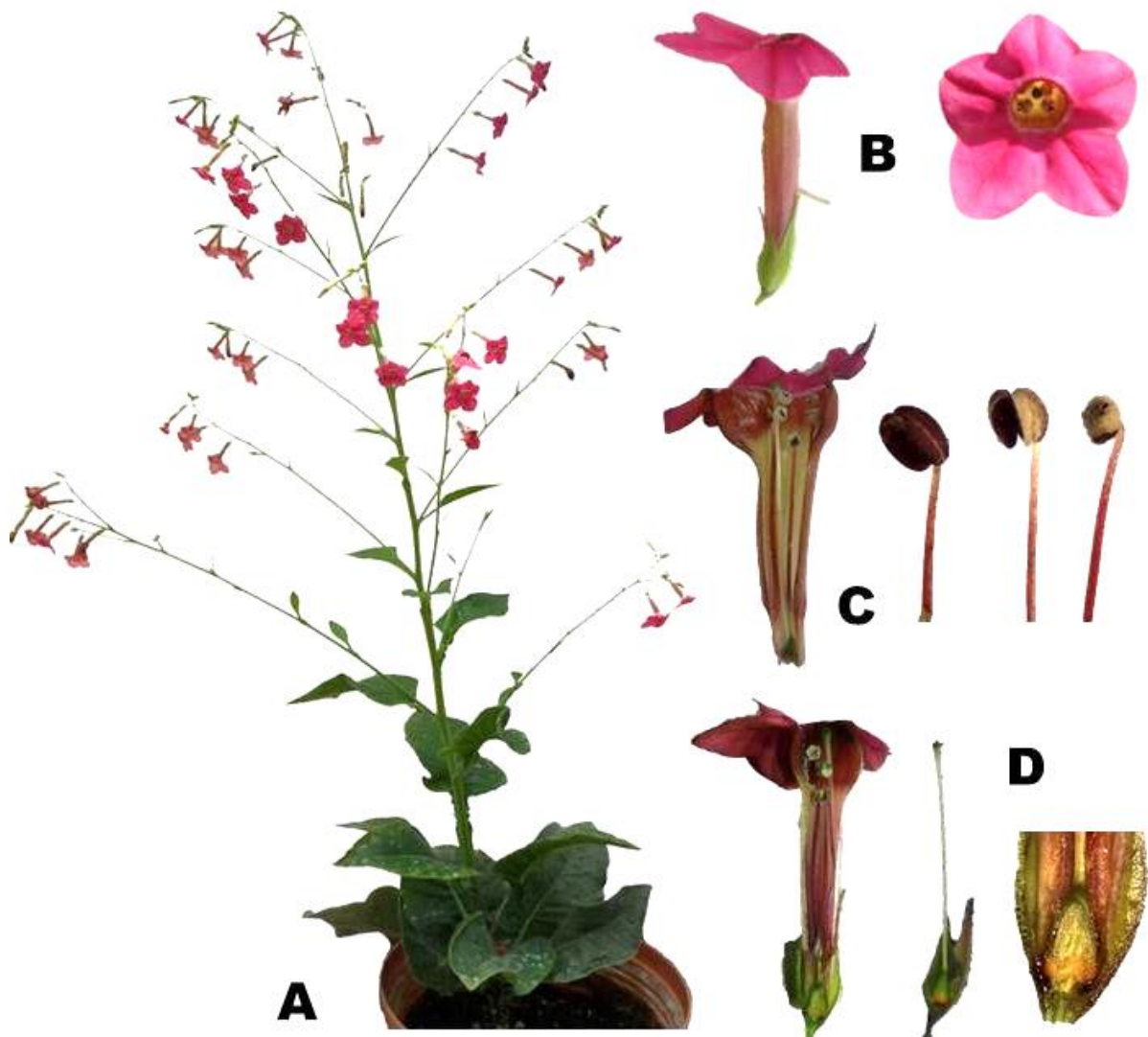
### 6.10. Rasgos botánicos de la especie

Dado que la especie en estudio no ha sido descrita botánicamente, se presentan los siguientes rasgos botánicos útiles para su identificación.

#### ***Nicotiana rastroensis* (Espinosa-Sánchez y Vázquez-Santana)**

Es una planta dicotiledónea; hierba perenne, con hojas basales formando una roseta, lanceoladas, alternas, pecioladas, sésiles; tallo erecto, ramificado, alcanza hasta 80 cm de altura (en invernadero); flores hermafroditas, actinomorfas y constan de cuatro verticilos: cáliz cilíndrico, compuesto de cinco sépalos, de color verde; corola gamopétala, en forma de tubo de 30.5-33.5 mm de longitud, de color rosa, formado por cinco pétalos, con tricomas en el envés. El androceo consta de cinco estambres, insertos en el interior del tubo de la corola, que miden en promedio de 17.5-20 mm de longitud y tienen un filamento largo, que sostiene a una antera. Las anteras son de color café y basifijas, constan de dos lóbulos y son tetrasporangiadas, con una línea de dehiscencia

longitudinal, extrorsa. El gineceo es sincárpico y bicarpelar; el estigma es bilobulado y de color verde en anthesis, con papilas estigmáticas que presentan abundante secreción en la superficie; el pistilo mide 19.7-19.8 cm de largo y el estigma se presenta por arriba de las anteras (para evitar la autopolinización), pero sin sobresalir del tubo de la corola; el ovario súpero de color verde, encierra cientos de óvulos (~336 óvulos), que aparecen unidos a una placenta axial, disco nectarífero y de color anaranjado, en la base del ovario; frutos en forma de cápsula, recubiertos por un cáliz persistente; semillas numerosas, pequeñas de color café (Figs. 24 y 25).



**Figura 24. Morfología vegetativa y floral de *Nicotiana rastroensis*.** Planta WT con hojas en la base que forman una roseta (A). Flores mostrando una corola tubular compuesta de cinco pétalos con ápice lobulados (B). Anteras insertadas en el interior de la corola, de color café, con dehiscencia longitudinal y con una alta producción de granos de polen (C). Gineceo compuesto por estigma de color verde, estilo largo y ovario que contiene cientos de óvulos (D).



**Figura 25. Etapas de desarrollo de *Nicotiana rastroensis*.** Desarrollo desde botón floral hasta flor en antesis.

## VII. DISCUSIÓN

El desarrollo de la flor es un proceso complejo. Las flores perfectas contienen cuatro regiones concéntricas, llamadas verticilos, con diferentes órganos cada una. En *Nicotiana glauca*, de afuera hacia adentro, hay cinco sépalos, cinco pétalos, cinco estambres y un ovario bicarpelar.

En cuanto a la embriología de la familia Solanaceae, Davis (1966) hace una descripción embriológica, en la que expone las siguientes características: para el androceo, la antera es tetrasporangiada, el desarrollo de la pared de la antera es de tipo dicotiledóneo, el endotecio desarrolla engrosamientos de una a dos capas efímeras, las células del tapete llegan a ser binucleadas. El tapete puede ser amiboideo o glandular. Las microsporas pueden ser tetraédricas, isobilaterales o decusadas. El grano de polen es bicelular y con grandes depósitos de almidón. El óvulo es anátropo, uni o bitégmico y tenuinucelado. El saco embrionario es de tipo *Polygonum*. Este mismo patrón de desarrollo fue encontrado en *N. glauca*, las flores WT, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza presentan anteras tetrasporangiadas, siguen un desarrollo de la pared de la antera de tipo dicotiledóneo, el grano de polen es bicelular. El óvulo es anátropo, bitégmico y el desarrollo del saco embrionario corresponde al de tipo *Polygonum*. Lo anterior también fue observado por Singh y Jain (1979), quienes reportaron un patrón de desarrollo similar en las flores de *N. glauca* en donde el inicio de los apéndices florales es centrípeto, el cáliz consta de cinco sépalos, la corola es gamopétala, con un tubo corto y cinco lóbulos, el androceo está formado por cinco estambres casi iguales y el gineceo es bicarpelar y sincárpico, con un ovario superior, bilocular, rodeado de numerosos óvulos.

El efecto morfológico más evidente encontrado en este trabajo fue el desarrollo de una doble corola acompañada por la inversión de la hercogamia. Hoy en día, las variedades de doble corola de diversas plantas ornamentales, incluyendo claveles, camelias, lilas, tulipanes y caléndulas de los pantanos, por mencionar sólo unos pocos, siguen siendo de moda. En el caso de las rosas, la gran mayoría de las variedades cultivadas presentan un rasgo de doble flor o doble corola (Meyerowitz *et al.*, 1989). Sin embargo, mientras que las variedades de doble corola han sido populares como plantas

ornamentales y de jardín, rara vez se encuentran en la naturaleza y, si lo son, por lo general sólo como individuos mutantes, presumiblemente debido a su baja aptitud relativa al tipo silvestre. La variedad doble corola de *Vinca minor flore pleno* parece producir menos flores que el tipo salvaje, y sus flores son moradas en lugar de azules. El carácter de doble corola se debe a la transformación parcial o completa de los estambres en el tercer verticilo en órganos petaloides (Wang *et al.*, 2011). *Hippeastrum* posee estructuras adicionales como tépalos dando como resultado una doble corola debido a las transformaciones de ambas estructuras reproductivas. Esta doble corola puede no tener partes reproductivas funcionales o puede producir algunas anteras que contienen polen en los extremos de algunos estambres de pétalos transformados, mientras que el ovario es extremadamente reducido con poco o ningún tejido estigmático (Liu and Yeh, 2015). En la especie *Primula vulgaris*, sus flores poseen una doble corola debido a una conversión homeótica dominante de sépalos en pétalos, por lo que su eficiente propagación tiene importantes aplicaciones comerciales (Li *et al.*, 2010; Hayta, 2016).

El fenotipo de doble corola de *N. rastroensis*, encontrado en este trabajo, ha sido reportado en otras especies del género; sin embargo, solo se presentó al realizar las autopolinizaciones y está ligado a una menor viabilidad en la fertilidad masculina. Al realizar la autopolinización de una planta silvestre (WT) de *N. rastroensis*, se detectaron malformaciones en la F<sub>1</sub>, que son la formación de una doble corola y una menor producción de granos de polen, estas malformaciones se acentuaron aún más, cuando se obtuvieron plantas de la F<sub>2</sub>. En el caso de la retrocruza, la retrocruza con corola normal es más importante que la retrocruza con doble corola, es decir, morfológicamente hay menos anomalías y esto también se expresa en la viabilidad.

Una forma de doble flor de *Nicotiana glauca* fue encontrado en una población F<sub>2</sub> de plantas con flores blancas. El análisis anatómico de las flores reveló unas protuberancias como pétalos, que surgen de los tejidos de anteras, conectivo y el filamento. Las protuberancias como pétalos pueden crear tipos únicos de flores, para realzar las cualidades deseables florales para uso ornamental. Un nivel de duplicación más fuerte que el padre, se observó en algunas líneas entre las plantas de la primera generación de



*N. alata* autopolinizada. Las flores, en estas plantas se deforman ligeramente, casi en forma de copa, sin rendimiento de la semilla, debido a la pobre producción de polen. La aparición de flores dobles se ha descrito en varias especies de solanáceas, incluyendo híbridos de *N. langsdorffii*, *N. tabacum* y *Petunia xhybrida*. En *N. tabacum* y *P. xhybrida*, se ha reportado que la flor doble está condicionada por genes simples, ya sean recesivos o dominantes (Zaino y Stimart, 2001).

### **Efectos de la fertilidad masculina y femenina**

Fisher (1941), desarrolló un modelo genético en el cual se demostró que en una población donde las plantas únicamente se reproducen a través de la polinización cruzada, cualquier mutación que promueva la autofertilización redundaría en una ventaja adicional en términos reproductivos. Esta ventaja adicional se obtiene sólo si los mutantes capaces de autofertilizarse producen la misma cantidad de semillas por entrecruzamiento vía paterna, es decir, que no sufran una reducción en la cantidad de polen disponible para donar con respecto a aquellas plantas que solamente se entrecruzan. Los mutantes capaces de autofertilizarse tendrían un 50% más de descendencia, con respecto a los fenotipos de entrecruzamiento. Este aumento en el éxito relativo de los mutantes haría que el alelo que incrementa la autofertilización fuera seleccionado a favor y la población evolucionaría hasta el sistema de apareamiento de autofertilización. En *Nicotiana rastroensis*, la cantidad de granos de polen disponibles si disminuye a medida que se pierde la variabilidad genética, por lo tanto la autopolinización, que se realizó en las plantas de la especie en estudio, no se vio favorecida.

La endogamia tiene un efecto negativo en la fertilidad masculina expresada por una menor producción de granos de polen y la viabilidad de éstos, ambos fenómenos son comunes cuando se tiene una baja variabilidad genética. En este trabajo, el número de granos de polen en las flores con doble corola es mayor que en las flores con corola normal; sin embargo, la germinación de granos es mayor en la corola normal, si se considera que es la germinación del grano de polen el proceso que contribuye al éxito reproductivo de una planta, las retrocruzas de corola normal son más importantes.

En muchos estudios se ha demostrado que la diversidad genética de las plantas que se autofecundan, es menor que las que promueven la fecundación cruzada (Wright *et al.*, 2002; Sweigart y Willis, 2003), entonces se espera que una especie autoincompatible como *N. ratroensis* no posea altos niveles de diversidad genética como una especie autocompatible. Teóricamente una de las ventajas de evitar la autofecundación es que se reduce la expresión de los genes recesivos, que tienen efectos deletéreos (Lande y Schemske, 1985; Charlesworth, 2002). Sin embargo, como en las especies que evitan la autofecundación, los apareamientos entre individuos emparentados siguen siendo posibles, si éstos aumentan, dicha ventaja selectiva podría desaparecer.

El efecto de la endogamia, en las poblaciones heterogéneas, heterocigotas, consiste en un incremento de la homocigosis, la cual trae como consecuencia efectos nocivos en los rasgos relacionados con la adecuación, lo anterior se le conoce como depresión endogámica, la cual se define como la pérdida de adaptación (vigor, viabilidad, fecundidad, etc.) (Poehlman, 1987; Saccheri *et al.*, 1996). La principal consecuencia de la endogamia es la reducción del valor fenotípico de las características cuantitativas, incluyendo aquellas que afectan los componentes del rendimiento (Falconer, 1989). Este incremento de la homocigosis origina un cambio en la frecuencia de genotipos, pero permanece constante en la frecuencia génica. Cuando un par de alelos se considera en estado heterocigoto (Aa) y se somete al proceso de autofecundación, esta condición se reduce en 50% en cada generación. En este estudio se encontró que todos los caracteres reproductivos manifestaron depresión endogámica en las flores F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza, como resultado del aumento del nivel de homocigosis ante la fijación de alelos y la reducción de heterocigosis.

En organismos capaces de realizar autofecundación, la depresión endogámica solo puede ser estudiada mediante la medición de supervivencia y/o reproducción de los individuos, después de una sola generación de autofecundación (Carr y Dudash 2003). Si se comienzan a realizar autofecundaciones a partir de individuos de una población, se observará que en las primeras generaciones se manifiesta una depresión del vigor y una

reducción de la fertilidad (en plantas y animales), hasta que se llega a lograr una estabilización de todas las características de las plantas y se llega a una línea pura (Harwood y Amos, 1998). En *N. rastroensis*, al ser autofecundadas manualmente, se observó que en la generación F<sub>1</sub>, se presentó una depresión endogámica manifestada en la corola, reducción en la cantidad y viabilidad de los granos de polen, así como en la cantidad de óvulos. En la F<sub>2</sub>, el grado de reducción fue aún mayor, ocasionado por el avance generacional. En la retrocruza, WT x F<sub>1</sub>, hubo una recuperación en dichos caracteres reproductivos.

La mayoría de las angiospermas producen flores hermafroditas, las cuales pueden ser polinizadas con su propio polen (autopolinización), o por polen de diferentes individuos o especies (polinización cruzada). Algunas angiospermas tienen ambos órganos sexuales muy cercanos, lo que incrementa la probabilidad de la autofecundación (de Nettancourt, 2001). Los efectos nocivos de la endogamia fueron documentados por primera vez por Charles Darwin (1876), quien fue motivado por el deseo de explicar por qué la reproducción cruzada prevalece en la naturaleza; los experimentos que Darwin realizó en 57 especies de plantas que se autofecundan y en aquellas con polinización cruzada, entre individuos no relacionados, confirma la hipótesis de que la autofecundación es perjudicial para la progenie producida, debido a que se presenta una disminución, tanto del vigor como de la fertilidad en la mayoría de las especies estudiadas (Charlesworth y Willis, 2009; Barrett, 2010; Fobis-Loisy y Gaude, 2010). Además, la progenie producida por autofecundación, generalmente es menos vigorosa que la producida por fecundación cruzada. Es decir, si las plantas que se autofecundan presentan depresión por endogamia, entonces se espera que se favorezcan mecanismos que faciliten la producción de hijos por medio de fecundación cruzada (Abarca *et al.*, 2010). Debido a esto, algunas especies desarrollaron adaptaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas para evitar la progenie con individuos cercanamente relacionados o incompatibles y mantener la diversidad genética en las generaciones subsecuentes (de Nettancourt, 2001; Goring y Silva, 2001). Aunque *Nicotiana rastroensis* es una especie autoincompatible, puede producir semillas por autopolinización manual, pero con

desventajas reproductivas, en donde se ve afectado el éxito reproductivo de su progenie dando paso a la expresión de la depresión endogámica. La intensidad de depresión endogámica fue mayor en la generación  $F_2$  que en la  $F_1$ , y la retrocruza. Los resultados de este experimento permitieron determinar el éxito de la autofecundación, pero no dentro de la misma flor, sino dentro del mismo individuo (geitonogamia).

## **Hercogamia**

Para que la autofecundación pueda ofrecer una garantía reproductiva es necesario que las funciones sexuales coincidan espacial y temporalmente. Principalmente, la variación en varios atributos florales como la dicogamia, la hercogamia, la morfología floral, el nivel de autocompatibilidad (interacciones químicas entre el estigma y los granos de polen), pueden afectar la magnitud del entrecruzamiento (Lloyd y Schoen, 1992)

Las plantas más hercógamas tienen niveles superiores de depresión endogámica (Stone y Motten, 2002), consistentes con la expectativa teórica sobre el papel de la hercogamia en la promoción del entrecruzamiento. La hercogamia evita el entrecruzamiento siempre que la separación entre anteras y estigmas supere los 3.5 mm (Motten y Stone, 2000).

Algunas adaptaciones morfológicas para prevenir la autopollinización, que han desarrollado las angiospermas son la dicogamia y la hercogamia. La dicogamia es la separación temporal de los órganos reproductivos para evitar la autofecundación y favorecer la fecundación cruzada. La hercogamia es la separación espacial de los pistilos y los estambres (Webb y Lloyd, 1986; de Nettancourt, 2001). La hercogamia dentro de una flor hermafrodita es una separación espacial de los órganos sexuales, ya sea por diferente longitud de los estambres y el pistilo o por su inclinación en lados opuestos en una misma flor. El primer caso puede tener dos variantes: 1) hercogamia homomórfica que consiste en que el pistilo sea más largo que los estambres, o bien, más corto (hercogamia inversa), pero todas las flores en una población tienen la misma morfología; y 2) heterostilia, cuando en una población se presentan dos o más morfos florales según

la longitud de los estilos. *Nicotiana rastroensis* presenta flores hermafroditas dicogámicas, en la cual maduran primero los órganos masculinos (androceo), pero estos son cortos y luego los órganos femeninos (gineceo) y, además, presenta hercogamia homomórfica, en donde el pistilo es más largo, lo anterior en el caso del morfo WT. Sin embargo, esta característica se pierde al realizar las autopolinizaciones. La separación que existe entre pistilo y estambres en el morfo WT es, en promedio, de 1.84 mm, menor que lo reportado en la literatura, pero con una variación muy pequeña por lo tanto es posible considerar que es una distancia suficiente para evitar la autofecundación. En la generación  $F_1$ , la diferencia de dichas estructuras fue muy variada y, por tanto, la hercogamia se perdió y se presentó la heterostilia. En la  $F_2$  la diferencia promedio entre el pistilo y los estambres fue de -0.8128 mm, es decir, la longitud del pistilo fue inferior a la de los estambres, por lo tanto el sistema presente en esta generación fue hercogamia inversa. Por último, en la retrocruza se presentaron dos variaciones: pistilo más largo que los estambres (retrocruza tubular) y pistilo más corto que los estambres (retrocruza no tubular), lo anterior corresponde al sistema hercogamia recíproca.

La heterostilia es un polimorfismo floral controlado genéticamente, caracterizado por la presencia de dos o tres morfologías florales: distilia y tristilia, en las cuales se presentan variaciones en la longitud del estilo y filamentos, tamaño y producción de granos de polen y tamaño de las papilas estigmáticas; lo cual es típico de las solanaceas y rubiaceas (Kohn y Barrett, 1992; Motten y Stone, 2000).

El modelo de mayor peso en la explicación de la heterostilia, se fundamenta en lo expuesto por Lloyd y Webb (1992), quienes proponen que el estado inicial es autocompatible y con separación de anteras y estigma en hercogamia de aproximación (estigma a mayor altura que anteras). La fuerza selectiva causó un aumento de eficacia en la transferencia de polen y el siguiente paso fue la aparición de dimorfismo estilar: hay dos longitudes de estilo, pero la altura de las anteras virtualmente no varía. Este estadio debe ser inestable y, por tanto, raro en la naturaleza, debiendo conducir a la hercogamia recíproca o heterostilia por el incremento y disminución de la altura de los estambres. Luego entonces, la hercogamia inversa, que aparece en la generación  $F_2$  de *N.*

*rastroensis*, se debe al incremento y disminución de la altura de los estambres en la generación F<sub>1</sub>, debido a que la fuerza selectiva causó un aumento en la eficacia de transferencia de polen y el siguiente paso fue el dimorfismo estilar, debido a que hay varias longitudes del pistilo, pero la altura de los estambres formalmente no varía. En la Fig. 21 se observa la longitud promedio que tienen el pistilo y los estambres del morfo WT y los de la F<sub>1</sub>, la longitud del pistilo y androceo del morfo WT es mayor que el de la F<sub>1</sub> y, además, este último presenta muchas variaciones en la longitud del pistilo. Sin embargo, la longitud promedio del androceo no presenta gran contraste y es así como se conduce en la F<sub>2</sub> a la hercogamia inversa.

En las especies autoincompatibles, la hercogamia puede funcionar principalmente para reducir la interferencia sexual, mientras que, en las plantas autocompatibles, se considera generalmente un carácter adaptativo, que reduce la probabilidad de autopolinización y aumenta la posibilidad de cruzamiento (Barrett, Luo y Widmer, 2013). De hecho, un número de estudios han reportado evidencia de una relación monótona creciente entre el grado de hercogamia y la tasa de fecundación cruzada a través de diversas especies de plantas, incluyendo *Nicotiana rustica*, una especie autocompatible (Breese, 1959).

En la actualidad, no hay duda de que la heterostilia se originó independientemente en numerosas ocasiones y de que está presente en al menos 28 familias de angiospermas (Barrett 2002). La heterostilia es un sistema lábil, y las transiciones desde y hacia otro tipo de polimorfismos son abundantes. Se han descrito distintos cambios desde el monomorfismo hacia la distilia, desde la heterostilia hacia la homostilia, desde la tristilia hacia la distilia, hacia otros tipos de polimorfismo, desde la distilia hacia la dioecia (Ferrero, 2014).

Con base en los resultados encontrados en este estudio, se propone un modelo que pretende explicar cómo las flores de *Nicotiana rastroensis* presentan transiciones desde la hercogamia hacia otros sistemas reproductivos. El morfo WT, que presentan una hercogamia por aproximación y al ser autopolinizada sufre depresión por endogamia, dando una generación F<sub>1</sub> con aparición de mutaciones en la longitud del pistilo y

estambres y a una gran pérdida de polen, debido a la baja reciprocidad entre los morfos; lo anterior, estrechamente ligadas al sistema de incompatibilidad y los morfos florales de esta generación obedecen a la heterostilia. En este contexto, una segunda mutación para la altura de las anteras supondría una ventaja, esto se observó en la  $F_2$ , donde se da una transición desde la heterostilia hacia la hercogamia revertida. Finalmente, en la retrocruza el sistema reproductivo que se presenta es hercogamia recíproca, en la que se favorece la función masculina promoviendo la dispersión del polen de manera eficiente y limitando a la vez la auto-interferencia entre los órganos sexuales de la propia planta y la consiguiente pérdida de gametos en polinizaciones no viables. Por su parte, el sistema de incompatibilidad mejora el éxito reproductivo femenino, impidiendo la autofecundación y reduciendo los efectos de la presión por endogamia (Fig. 26). Dado que todos los factores ambientales y el diseño bajo el cual se hicieron las autopolinizaciones son los mismos que se aplicaron desde el morfo silvestre, la única razón que podría estar implicada para que esto suceda es la depresión por endogamia.

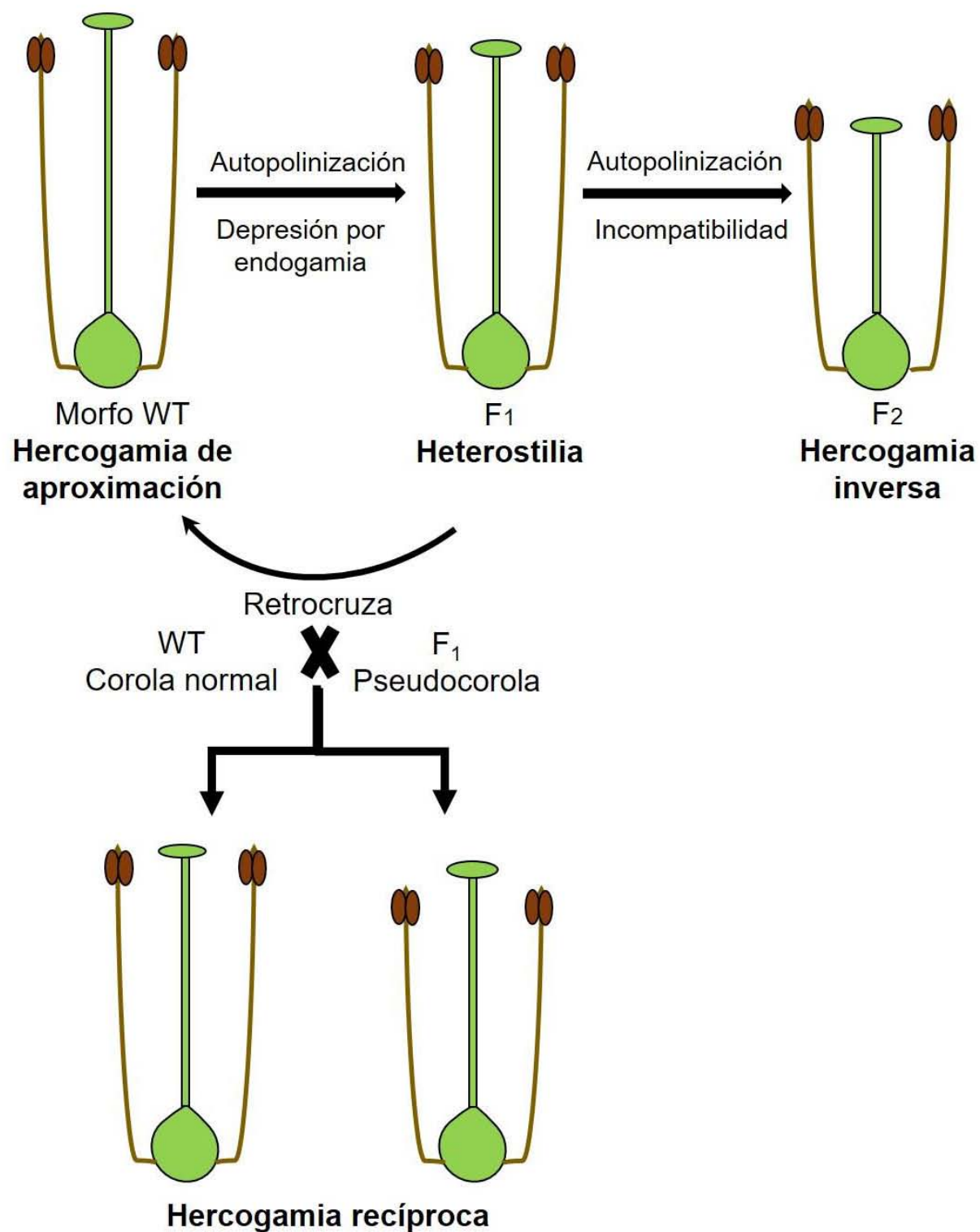


Figura 26. Transición desde la hercogamia hacia otros atributos florales en *Nicotiana glauca*.



El conocimiento de la estructura floral y de la biología reproductiva de una especie, es básico para el mejoramiento de plantas, con el fin de desarrollar técnicas de emasculación e hibridación, como estrategia de control de la polinización (Araméndiz *et al.*, 2009). De acuerdo con Gomes *et al.*, (2001), el rápido progreso logrado en el mejoramiento genético de plantas, obedece al estudio de los procesos reproductivos que ocurren en las flores.

La interferencia sexual, interferencia entre la función masculina y femenina, depende de la longitud y forma de la corola (tubular o no), así como de la morfología e identidad del polinizador. Además, la interferencia sexual y la obstrucción del estigma/estilo con polen incompatible varía entre especies (Keller *et al.*, 2014).

En el morfo silvestre, las anteras quedan por debajo del pistilo y la abertura de la corola, por lo tanto, el polinizador deberá penetrar o introducir el pico (en el caso de los colibríes), para fungir como un agente polinizador, el hecho de que la hercogamia se revierta, probablemente cambie también la eficiencia de un polinizador o facilite la interacción con otro tipo de polinizadores, sin embargo, esto debe ser estudiado con detalle. Las dobles corolas generadas en *Nicotiana rastroensis* pueden presentar una ventaja en la atracción hacia los polinizadores, con respecto a esta nueva morfología que se presentan en las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza. Retomando lo dicho por Kaczorowski *et al.* (2005), respecto a los polinizadores y visitantes florales, para los colibríes, que son los polinizadores, no tendría un efecto negativo la presencia de una doble corola, sino que, al contrario, los atraería más. El abejorro del género *Bombus* que es un robador de néctar, se ve obligado a perforar en la base del tubo de la corola para extraer el néctar (Navarro, 2000), ante la doble corola ahora *Bombus* tendrá que perforar, no solo una sino dos capas de pétalos, ¿esto disminuirá la eficiencia de *Bombus* como ladrón de néctar? Tal vez si, ya que la presencia de una doble corola protege más a *N. rastroensis* de estos robadores de néctar y, a su vez, se promueve más la visita de colibríes.

## VIII. CONCLUSIÓN

El desarrollo floral de *Nicotiana rastroensis*, en el morfo silvestre, así como en las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza, obedece al mismo patrón reportado para la familia Solanaceae.

Las características morfológicas de la flor silvestre de *N. rastroensis* es muy similar a las especies de la sección *Alatae*.

La alteración morfológica más evidente, producto de las autopolinizaciones en la F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza, es el desarrollo de una doble corola, que posee apéndices con características muy similares a la de los pétalos.

La autoincompatibilidad de *N. rastroensis* solo es funcional entre los órganos de la misma flor; sin embargo, no es funcional entre las flores del mismo individuo, por lo tanto, la geitonogamia tiene consecuencias negativas en la fertilidad masculina y femenina.

La heterostilia, la hercogamia inversa y la hercogamia recíproca presentes en las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruza, respectivamente, son una serie de estrategias que las plantas desarrollan para disminuir la depresión endogámica.

## IX. LITERATURA CITADA

- Abarca, C., Cuevas, E., y Domínguez, C., 2010. ¿Es la evolución de la dioecia un callejón sin salida? *Ciencias* 99: 10-13.
- Ainsworth, C., 2000. Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious *Plants*. *Annals of Botany* 86: 211–221.
- Anderson, M., Cornish, A.E.C., Mau, S.L., Williams, E.G., Hoggart, R., Atkinson, A., IBönig, Grego, B., Simpson, R., Roche, P.J., Haley, J.D., Penschow, J.D., Niall, H.D., Tregear, G.W., Coughlan, J.P., Crawford, R.J., and Clarke, A.E., 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature* 321:38-44.
- Araméndiz, H., Cardona, C., y Espitia, M., 2009. Caracterización de la morfología floral de dos cultivares de berenjena (*Solanum melongena* L.) (Solanaceae). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 62 (2): 5125-5134.
- Barrett, S.C.H., and Kohn, J., 1991. The genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (Eds. D. Falk & K.E. Holsinger), pp. 3–30. Oxford University Press.
- Barrett, S.C.H., 2002. The Evolution of Plant Sexual Diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H., 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 991–1004.
- Barrett, S.C.H., 2010. Understanding plant reproductive diversity. *Philos Trans R Soc Lond Ser. B.* 365: 99–109.
- Bawa, K., and Beach, J., 1981. Evolution of Sexual Systems in Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 254-274.
- Belyaeva, R.G., 1995. Genetic study of double flower mutation in plants with monocarpic shoot. *Genetika* 31: 674-677.
- Bhojwani, S., and Bhatnagar, S., 2000. The embryology of Angiosperms. Vikas Publishing House PVT LTD.
- Breese, E.L., 1959. Selection for differing degrees of out-breeding in *Nicotiana rustica*. *Annals of Botany NS* 23: 331–344.

- Carr, D., and Dudash, M., 2003. Recent approaches into the genetic basis of inbreeding depression in plants. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1071-1084.
- Charlesworth, D., 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88: 94-101.
- Cruz-García, F., Hancock, C.N., and McClure, B., 2003. S-RNase complexes and pollen rejection. *Journal of Experimental Botany* 54: 123–130.
- Davis, G.L., 1966. Systematic embryology of the Angiosperms. New York: John Wiley and Sons.
- De Nettancourt, D., 1977. Incompatibility in Angiosperms. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlang.
- De Nettancourt, D., 2001. Incompatibility and incongruity in Wild a Cultivated Plants. 2nd eds. Berlin: Springer.
- Dellaporta, S., and Calderón-Urrea, A., 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell* 5: 1241-1251.
- Dickinson, H.G., 1990. Self-incompatibility in flowering plants. *Bioessays* 12: 155-161.
- Dickinson, H.G., Crabbe, M.J.C., and Gaude, T., 1992. Sporophytic selfincompatibility systems: S gene products. *Internatl. Rev. Cytol.* 140: 525-561.
- Esau, K., 1982. Anatomía de las Plantas con Semilla. Buenos Aires: Hemisferio Sur. 512 pp.
- Falconer, D.S., 1989. Introduction to quantitative genetics. New York: Logman. 340 pp.
- Ferrero, V., 2014. Heterostilia, ¿qué sabemos hasta el momento. *Ecosistemas* 23(3): 23-30.
- Franklin-Tong, N.V., and Franklin, F.C., 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.* 8: 598-605.
- Flores, E., 1999. La Planta: estructura y función. Costa Rica: Libro Universitario Regional. 884 pp.
- Harwood, J., and Amos, W., 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Phil Trans. R. Soc. Lond.* 353: 177-186.

- Hayta, S., Smedley, M., Li, J., Harwood, W., and Gilmartin, P., 2016. Plant Regeneration from Leaf-derived Callus Cultures of Primrose (*Primula vulgaris*). *HortScience* 51 (5): 558-562.
- Huang, S., Lee, H.S., Karunanandaa, B., and Kao, T., 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S protein is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell* 6: 1021-1028.
- Igic B., and Kohn, J.R., 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13167–13171.
- Igic, B., Bohs, L., and Kohn, J.R., 2004. Historical inferences from the self-incompatibility locus. *New Phytologist* 161: 97–105.
- Jiménez-Durán, K., y Cruz-García, F., 2011. Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34 (1): 1-9
- Kaczorowski, R., Gardener, M., and Holtsford, T., 2005. Nectar traits in *Nicotiana* section *Alatae* (Solanaceae) in relation to floral traits, pollinators, and mating system. *American Journal of Botany* 92(8): 1270-1283.
- Kaczorowski, R., Seliger, A., Gaskett, A., Wigsten, S., and Raguso, R., 2012. Corolla shape vs. size in flower choice by a nocturnal hawkmoth pollinator. *Functional Ecology* 26: 577-587.
- Kao, T.H., y McCubbin, A.G., 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self-pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12059-12065.
- Keller, B., Thomson, J., and Conti, E., 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses. *Functional Ecology* DOI: 10.1111: 1365-2435.
- Kelly L., Leitch A., Clarkson J., Hunter R., Knapp S. and Chase M. 2010. Intragenic Recombination Events and Evidence for Hybrid Speciation in *Nicotiana* (Solanaceae). *Mol. Biol. Evol.* 27(4): 781-799.
- Kohn, J.R., and Barret, S.C., 1992. Experimental studies on the functional significance of heterostyly. *Evolution* 46 (1): 43-55.
- Lande, R., and Schemske, D.W., 1985, The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants I. Generic models. *Evolution* 39: 24-40.

- Lebel-Hardenack, S., and Grant, S., 1997. Genetics of sex determination in flowering. *Trends in Plant Science* 2 (4): 130-136.
- Lee, C., Page, L., McClure, B., and Holtsford, T., 2008. Post-pollination hybridization barriers in *Nicotiana* section *Alatae*. *Sex Plant Reprod* 21: 183-195.
- Liu, M., and Yeh, D., 2015. 'T.S.S. No.1-Pink Pearl': A Double-Flowered and Fragrant Amaryllis Cultivar. *HortScience* 50 (10): 1588–1590.
- Lloyd, D.G., and Schoen, D.J., 1992. Self- and Cross Fertilization in Plants.I. Functional Dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153(3): 358-369.
- Lloyd, D.G., and Webb, C.J., 1992. The evolution of heterostyly. pp. 151-178. In: Barrett, S.C.H. (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Germany: Springer-Verlag.
- López, M.L., Márquez, J., y Murguía, G., 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. México: Las prensas de Ciencias, 178 pp.
- Luo, Y., and Widmer, A., 2013. Herkogamy and Its Effects on Mating Patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8 (2): e57902.
- Márquez, J., Collazo, M., Martínez, J., Orozco, A., y Vázquez, S., 2013. Biología de angiospermas. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Massinga, P.H., Johnson, S.D., and Harder, L.D., 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Annals of Botany* 95: 389-399.
- Mauseth, J., 2003. Botany. An introduction to plant Biology. 3th ed. USA: Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts,. 848 pp.
- McClure, B., Haring, V., Ebert, P.R., Anderson, M.A., Simpson, R.J, Sakiyama, F., and Clarke, A.E., 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature* 342: 955 - 957.
- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., and Bernatzky, R., 1999. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 13548-13553.
- McClure, B., Cruz-García, F., Beecher, B., and Sulaman, W., 2000. Factors affecting inter and intra specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann. Bot. Suppl.* 85A: 113-123.

- McClure, B., and Frankling-Tong, V., 2006. Gametophytic selfincompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in self-pollen tube inhibition. *Planta* 224: 233-245.
- Meyerowitz, E.M., Smyth, D.R., and Bowman, J.L., 1989. Abnormal flowers and pattern formation in floral development. *Development* 106: 209–217.
- Motten, A.F., and Stone, J.L., 2000. Heritability of stigma position and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 87(3): 339-347.
- Li, J., Dudas, B., Webster, M., Cook, H., Davies, B., and Gilmartin, P., 2010. Hose in Hose, an S locus–linked mutant of *Primula vulgaris*, is caused by an unstable mutation at the Globosa locus. *PNAS* 107 (12):5664-5668.
- Navarro, L., 2000. Pollination ecology of *Anthyllis vulneraria subsp. vulgaris* (Fabaceae): nectar robbers as pollinators. *American Journal of Botany* 87(7): 980-985.
- Poehlman, J.M., 1987. Breeding field crops. 3<sup>rd</sup> ed. VI Publishing company. Westport, Connecticut, USA. 715 pp.
- Raghavan, V., 1997. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge: Cambridge University Press.
- Raguso, R., Schlumpberger, B., Kaczorowski, R., and Holtsford, T., 2006. Phylogenetic fragrance patterns in *Nicotiana* sections *Alatae* and *Suaveolentes*. *Phytochemistry* 67: 1931-1942.
- Reynolds, J. and, Tampion, J., 1983. Double flowers: A Scientific Study. New York: Van Nostry Reinhold.
- Saccheri, I., Brakefield, P., and Nichols, R., 1996. Severe inbreeding depression and rapid fitness rebound in the butterfly *Bicyclus anynana* (Satyridae). *Evolution* 50(5): 2000-2013.
- Sattler, R., 1988. Homeosis in plants. *American Journal of Botany* 75: 1606–1617.
- Scovel, G., Ben-Meir, H., Ovadis, M., Itzhaki, H., and Vainstein, A., 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theor. Appl. Genet.* 96: 117–122.

- Sijacic, P., Wang, X., Skirpa, A.L., Wang, Y., Dowd, P.E., McCubbin, A.G, Huang, S., and Kao, T., 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302-305.
- Silvertown, J., and Charlesworth, D., 2001. Introduction to Plant Population Biology. 4<sup>th</sup> ed. USA: Blackwell Publishing. 360 pp.
- Singh, V., and Jain, D.K., 1979. Organogenesis of flower in *Nicotiana rustica* L. Solanaceae). *Proc. Indian natn Sci. Acad. B* 45(6): 571-576.
- Stone, J.L., 2002. Molecular mechanisms underlying the breakdown of gametophytic self-incompatibility. *The Quarterly Review of Biology* 77: 17–32.
- Stone, J.L., and Motten, A.F., 2002. Anther–stigma separation is associated with inbreeding depression in *Datura stramonium*, a predominantly selfing annual. *Evolution* 56: 2187–2195.
- Sullivan, J.A, Shirasu, K., and Deng, X.W., 2003. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Rev. Genet.* 4: 948-958.
- Takayama, S., and Isogai, A., 2005. Self-Incompatibility in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 467-489.
- Webb, C.J., and Lloyd, D.G., 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *Taxon* 24: 163-178.
- Tanaka, Y., Oshima, Y., Yamamura, T., Sugiyama, M., Mitsuda, N., Ohtsubo, N., Ohme-Takagi, M., and Terakawa, T., 2013. Multi-petal cyclamen flowers produced by AGAMOUS chimeric repressor expression. *Scientific Reports* 3: 2641.
- Wang, Y., Melzer, R., and Theißen, G., 2011. A double-flowered variety of lesser periwinkle (*Vinca minor fl. pl.*) that has persisted in the wild for more than 160 years. *Annals of Botany* 107: 1445-1452.
- Yamame, H., and Tao, R., 2009. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of S-genotyping in Rosaceous fruit trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78: 137-157.
- Zainol, R., Stimart, D.P., Evert, R.F., 1998. Anatomical analysis of double flower morphogenesis in a *Nicotiana alata* mutant. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123: 967–972.
- Zainol, R., and Stimart, D.P., 2001. A monogenic recessive gene, Fw, conditions flower doubling in *Nicotiana alata*. *HortScience* 36: 128-130.