



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Biología floral y reproductiva de *Echeveria
strictiflora* A.Gray y *Echeveria subalpina*
Rose & Purpus (Crassulaceae).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JONATHAN ÁLVAREZ ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. FLORENCIA TIBERIA AUCÁN GARCÍA
CAMPUSANO.



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Jerónimo Reyes Santiago, la M. en C. Ángeles Islas y la Biol. Noemí Hernández por proveer las plantas de *Echeveria* y la asesoría necesaria para la realización de trabajo.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías del laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de la Facultad de Ciencias de la UNAM y al Químico Saúl Sánchez Becerril del Cenid-Comef, INIFAP, por el procesamiento de las muestras, captura y edición de las imágenes en microscopio electrónico de barrido.

A la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín del laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM por la captura y edición de las imágenes de los tubos polínicos en microscopio de fluorescencia.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana y el M. en C. Aldebarán Camacho Velázquez del laboratorio de Desarrollo de Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM quienes además de participar como revisores de este trabajo como sinodales, también facilitaron espacio y material para realizar los cortes histológicos y las tinciones de las cámaras ováricas.

Al Dr. Ulises Rosas del laboratorio de Raíces del Jardín Botánico de la UNAM por la propuesta del tema de tesis, su asesoría durante la realización de este trabajo y su revisión como sinodal.

A la Dra. Florencia García del Cenid-Comef, INIFAP, quien participó como asesora de este trabajo, proporcionó el espacio y los materiales necesarios para realizar los trabajos experimentales y me dio constante ánimo para continuar con el trabajo.

A las profesoras Ivalú Cacho, Alejandra Vasco y Rosalinda Tapia, así como a mis compañeros: Andrea, Brenda, Fernanda, Itzel, Joel (Moh), Jonathan Vega, Valeria y Verónica, quienes participaron activamente en la construcción y dirección de este proyecto con sus sugerencias y dudas.

Agradecimientos personales

A mi madre, María Luisa y a mis hermanos, Carlos y Gustavo, quienes me han brindado ayuda durante toda mi vida para continuar con mis estudios y llegar hasta el lugar en el que estoy ahora. La unión familiar nos permitió superar todas las adversidades.

A los amigos que han formado parte de mi experiencia en la carrera (e incluso durante más tiempo), con quienes compartí charlas y momentos felices que me hicieron sentir que elegí el camino correcto: Moh, Ayala, Bryan, Josa, Noemí, Hokabek, Betty, Ángel, Miguel y a los Fibonachos. Por último, a Emily García, quien a pesar de ya no formar parte de este momento y de todos los momentos amargos, forma parte de las experiencias positivas y significativas de la carrera.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	4
Resumen	5
Summary	6
Introducción	7
Antecedentes	8
1.1 Biología reproductiva.....	8
1.2 Potencial reproductivo.....	12
1.3 Hibridación en plantas.....	12
1.4 Características de la familia Crassulaceae.....	12
1.5 El género <i>Echeveria</i>	13
1.6 Importancia cultural.....	14
1.7 Morfología de las especies del género <i>Echeveria</i>	15
1.8 Biología reproductiva del género <i>Echeveria</i>	15
1.9 <i>Echeveria strictiflora</i>	17
1.10 <i>Echeveria subalpina</i>	18
Planteamiento del problema	20
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	21
Material y métodos	21
Resultados	27
Discusión	43
Conclusiones	53
Perspectivas	54
Referencias	55
Anexos	66

ÍNDICE DE FIGURAS

1. <i>Echeveria strictiflora</i>	17
2. <i>Echeveria subalpina</i>	18
3. Fenología de <i>E. strictiflora</i> y <i>E. subalpina</i>	18
4. Filogenia del género <i>Echeveria</i>	19
5. Comparación de las flores de <i>Echeveria strictiflora</i> y <i>Echeveria subalpina</i>	28
6. Comparación de cortes longitudinales de flores en antesis.....	29

7. Morfología de los granos de polen.....	30
8. Comparación del crecimiento de los tubos polínicos.....	32
9. Pistilo, ovario y óvulos de <i>E. strictiflora</i>	34
10. Pistilo, ovario y óvulos de <i>E. subalpina</i>	35
11 Corte transversal de ovarios.....	36
12. Comparación morfológica de las semillas.....	40
13. Comparación de los porcentajes de germinación en los diferentes tratamientos de apareamiento.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

1. Especies mexicanas del género <i>Echeveria</i>	14
2. Clasificación de las etapas del desarrollo floral.....	22
3. Características florales cualitativas y cuantitativas.....	26
4. Valores correspondientes al sistema de cruce de acuerdo con OCI....	26
5. Características cuantificables del tamaño de las flores.....	29
6. Receptividad del estigma.....	29
7. Comparación de la producción de frutos y semillas.....	37
8. Valores de OCI, tasa de entrecruza e índice de depresión endogámica.....	39
9. Valores de OCI, tasa de entrecruza y depresión endogámica.....	43

ABREVIATURAS

CAM: Por sus siglas en inglés (Crassulaceae Acid Metabolism). Metabolismo Ácido de las Crasuláceas.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

MEB: Microscopio electrónico de barrido.

NOM-059-SEMARNAT-2010: Norma Oficial Mexicana-059 Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales-2010.

OCI: Por sus siglas en inglés (Outcrossing index). Índice de entrecruza.

LSI: Por sus siglas en inglés (Late Self-Incompatibility). Autoincompatibilidad tardía.

REPSA: Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

RESUMEN

Echeveria strictiflora y *Echeveria subalpina* son dos especies de plantas suculentas que se distribuyen en regiones áridas del norte y centro de México, respectivamente. Debido a que se desconocen las condiciones que permiten su reproducción y a que existe interés por promover su propagación para sembrarlas en jardines, azoteas y paredes verdes, es importante caracterizar los atributos florales, así como evaluar potenciales factores que limiten la fecundación y la producción de semillas viables en estas especies.

Con este fin, se describió, tanto para *E. strictiflora* como *E. subalpina*, la morfología y la funcionalidad de los verticilos sexuales (receptividad del estigma, número de óvulos, número y viabilidad de granos de polen, crecimiento de tubo polínico por el estilo); además, se examinaron los sistemas de cruce y de apareamiento, así como el potencial para formar híbridos. Finalmente se evaluó la producción y germinación de semillas obtenidas a través de tratamientos autocruzas y entrecruzas intra e interespecíficas.

Se determinó que ambas especies son hermafroditas y hercógamas, aunque *E. strictiflora* es una especie protógina incompleta mientras que *E. subalpina* es homógama. El crecimiento de tubos polínicos hasta el ovario y la producción de semillas con los diferentes sistemas de cruce evidenció la ausencia de sistemas de autoincompatibilidad.

Tanto *E. strictiflora* como *E. subalpina* se reproducen mediante autocruza y entrecruza, además de que tienen el potencial de hibridar de forma recíproca. Así mismo, se encontró que la entrecruza intra e interespecífica produjo la mayor cantidad de semillas viables, lo que indicó que el sistema de apareamiento de ambas especies es mixto con tendencia a la entrecruza. El menor número de semillas obtenidas por autocruza y su germinación disminuida, puede indicar un efecto por depresión endogámica.

Esta información es la base para comprender los procesos reproductivos que se presentan en *E. strictiflora* y *E. subalpina*, además de que representa un antecedente para estudios sobre la conservación, el manejo, y propagación de especies del género *Echeveria*.

SUMMARY

Echeveria striciflora and *Echeveria subalpina* are two species of succulent plants that grow in the arid regions of northern and central Mexico, respectively. Because little is known about the conditions that allows their reproduction, and there is interest in promoting their propagation for use in in gardens, roofs and green walls, it is important to characterize floral attributes, and evaluate potential factors that may limit fertilization and production of viable seeds in these species.

To this aim, the morphology and functionality of sexual whorls (stigma receptivity, number of ovules, number and viability of pollen grains, pollen tube growth along the style), were described for both *E.striciflora* and *E. subalpina*; in addition, the pollination and mating systems, as well as the potential to form hybrids were examined. Finally, the production and germination of seeds obtained through selfing and intra and interspecific pollination were evaluated.

Both species were found to be hermaphroditic and hercogamous, although *E.striciflora* is an incomplete protogynous species, whereas *E. subalpina* is homologous. The growth of pollen tubes to the ovary and the production of seeds, irrespective of the pollination system, evidenced the absence of self-incompatibility.

Both *E.striciflora* and *E. subalpina* reproduce by self and cross-pollination, in addition to having the potential to hybridize reciprocally. Likewise, the intra and interspecific cross-pollinated flowers produced the greatest amount of viable seeds, which indicated that both species exhibit a mixed breeding system with a tendency to outcrossing. The lower number of seeds obtained by self-pollination and their decreased germination, may indicate an effect by inbreeding depression.

This information is the basis for understanding the reproductive processes that occur in *E. strictiflora* y *E. subalpine*, and provide background information for future studies on the conservation, management and propagation of species of the genus *Echeveria*

INTRODUCCIÓN

El género *Echeveria* es nativo del continente americano, constituido por alrededor de 170 especies descritas y aceptadas, de las cuales, cerca del 80 % crecen en México (Reyes-Santiago *et al.*, 2011). La mayoría existen como poblaciones pequeñas en hábitats áridos, dentro de áreas con una historia climática y geológica con cambios constantes (Uhl, 1992), donde juegan un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas al contribuir al proceso de sucesión primaria y pedogénesis, así como en el establecimiento de microambientes como plantas nodrizas (Reyes-Santiago *et al.*, 2011). Este género es característico en México, debido al alto endemismo de especies, su significado histórico-cultural y su importancia comercial como plantas de ornato (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2015).

Echeveria strictiflora A. Gray y *Echeveria subalpina* Rose & Purpus se distribuyen naturalmente en México. Mientras que *E. strictiflora* se encuentra al norte del país y en Texas, E.U.A., *E. subalpina* es endémica a la región de Totolcingo entre Tlaxcala, Puebla y Veracruz (Naturalista, 2019a, 2019b). Debido a su hábito de crecimiento y tolerancia a la sequía son atractivas para usarse en jardines, muros y azoteas verdes, por lo cual forman parte del programa de propagación de plantas de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) del Jardín Botánico de la UNAM. Sin embargo, a la fecha es poco lo que se conoce sobre la biología reproductiva y los aspectos que promueven el reclutamiento de nuevos individuos *ex situ* o de las posibles limitaciones que pueda exhibir en sus sitios naturales (*in situ*).

El conocimiento de la reproducción en el género *Echeveria* es escaso y se limita a pocas especies (Parra-Tabla *et al.*, 1993; Parra-Tabla *et al.*, 1998; Reyes-Santiago *et al.*, 2011). Tanto *E. strictiflora* y *E. subalpina* se caracterizan por desarrollar flores hermafroditas en inflorescencias de tipo cincino, que emergen a partir de un escapo (Reyes-Santiago *et al.*, 2011). Coinciden en la época de floración (marzo a noviembre) (Naturalista, 2019a, 2019b), a pesar de que provienen de regiones geográficas que difieren en el tipo de clima y régimen de lluvias (INEGI, 2017a, 2017b). Si bien en el género *Echeveria* se reporta la reproducción por autogamia (Walther, 1972; Parra-Tabla *et al.*, 1998) e incluso la formación de híbridos (Uhl, 2005), se desconoce si *E. strictiflora* y *E. subalpina* presentan alguna restricción a la autopolinización o a la cruce interespecífica. El reconocimiento de estos rasgos distintivos es particularmente importante para especies raras o con poblaciones pequeñas y aisladas (Uhl, 1992), ya que permite conocer la existencia de potenciales barreras reproductivas, la

eficiencia en la producción de semillas de acuerdo con los sistemas de apareamiento y la compatibilidad entre dos especies diferentes desarrolladas en distintos ambientes (Sreekala, 2017).

Por dichas razones, en el presente trabajo se caracterizó la biología floral de *E. strictiflora* y *E. subalpina*, para lo cual se comparó la fertilidad de los verticilos florales, los sistemas de cruza y apareamiento, así como la eficiencia de la formación de semillas por sistema de cruza. Finalmente, se identificó la capacidad de producción y germinación de semillas híbridas entre ambas especies. Esta información representa un antecedente importante para comprender los procesos reproductivos que se presentan en ambas especies y servir de base para estudios sobre la conservación, el manejo, mejoramiento y propagación del género *Echeveria*.

ANTECEDENTES

Biología reproductiva

La biología reproductiva se refiere al estudio de los caracteres de los individuos y las condiciones externas que mantienen la reproducción tanto sexual como asexual dentro de las especies (Ramawat *et al.*, 2016). En las angiospermas, la diversidad floral es un atributo inherente a las estrategias reproductivas de cada especie, que promueve el encuentro de gametos masculinos y femeninos entre individuos de una población (Vogler y Kalisz, 2001). Dentro de esta diversidad existen flores hermafroditas (perfectas) y flores unisexuales (masculinas y femeninas), lo que impacta directamente en los síndromes de polinización, a los sistemas de cruza, de apareamiento y el nivel de incompatibilidad que existe dentro de cada especie (Barrett, 2002).

La biología reproductiva explora los diversos aspectos en el proceso de la reproducción y la adecuación de los individuos en una población, e incluye: la fenología, la morfología floral, los síndromes de polinización, los sistemas sexuales (flores hermafroditas vs. unisexuales), los sistemas de apareamiento, los sistemas de cruza, la duración de la anthesis, la función temporal de los sexos (dicogamia), el espacio intrafloral entre los verticilos sexuales (hercogamia), la funcionalidad del gineceo y androceo, entre otros (Matias-Palafox *et al.*, 2017). Aunado a lo anterior, numerosas especies, generalmente poliploides, se reproducen vegetativamente a nivel del cuerpo primario o a nivel del megasporangio

(apomixis), lo cual resulta en la propagación de individuos genéticamente idénticos al individuo progenitor, en ausencia de fertilización entre gametos, si bien la reproducción sexual es la más extendida y favorable a lo largo de las angiospermas (Herben *et al.*, 2017). Todos estos procesos permiten el reconocimiento de los procesos que conlleva la reproducción en cada especie, lo que es esencial para comprender las relaciones ecológicas de las especies, ya que a través de ella se pueden evaluar las barreras reproductivas pre y postcigóticas que limitan la fertilización entre individuos. Así mismo, esta información ofrece herramientas que se puede aplicar en proyectos que tengan como objetivo aumentar el reclutamiento de nuevos individuos para su conservación y aprovechamiento (Sreekala, 2017).

En las especies con reproducción sexual, la dispersión y unión de los distintos gametos (masculino y femenino) ocurre fundamentalmente por medio de la autocruza, la entrecruza o mediante un sistema mixto, en el que intervienen ambos modos anteriores, lo cual se conoce como sistema de cruza (Barrett, 2003; Neal y Anderson, 2005). Estos tienen un profundo efecto sobre la ecología y distribución de las poblaciones de plantas, ya que a partir de ellos se definen los síndromes de polinización y el movimiento de los granos de polen (Vogler y Kalizs, 2001). Los sistemas de cruza dependen del taxón y del ambiente en el que se desarrollen los individuos, principalmente por el desarrollo de sistemas que evitan la autofertilización con el fin de favorecer la diversidad genética y los efectos deletéreos de la depresión por endogamia, que perjudica la producción de semillas, y por lo tanto, a la descendencia (Takayama e Isogai, 2005).

Sin embargo, la autocruza se considera una estrategia útil para especies en proceso de ocupación de nuevos nichos debido a que no depende del transporte por polinizadores, lo que asegura el desarrollo de frutos y semillas de forma independiente (Wang *et al.*, 2004). La autocruza se expresa en dos formas: la autogamia, que consiste en la transferencia de polen al estigma dentro de la misma flor; esta se considera como una respuesta a condiciones adversas donde los polinizadores son escasos o tienen un período limitado de floración, por lo que es un método con mayor presencia en plantas anuales que en plantas perennes (Voillemot y Pannell, 2017). De manera similar, la geitonogamia consiste en la transferencia de polen entre flores del mismo individuo, por lo que las consecuencias genéticas son las mismas que la autogamia (Lloyd y Schoen, 1992). Por otra parte, la entrecruza o polinización cruzada, se trata de la fertilización de las flores entre individuos diferentes, ya sea de la misma especie (intraespecífica) o de especies diferentes (interespecífica), lo cual permite una mayor diversidad genética que la autocruza (Batygina, 2019), además, puede solventar estragos inducidos por ciertos cambios ambientales (Barrett, 2002). En el caso de la reproducción

mixta, está relacionada con una mayor adecuación en ambientes con condiciones climáticas cambiantes, en el que la actividad de polinizadores es variable, por lo que aún en su ausencia, estas plantas son capaces de reproducirse por autocruza (Cruden y Lyon, 2019).

El principal riesgo que representa la autofecundación es la depresión endogámica. Esto ocurre a través de la singamia de gametos genéticamente similares (que pueden pertenecer al mismo individuo o a la misma flor), por lo que hay una mayor tendencia a la homocigocidad, y por lo tanto, a la potencial expresión de genes recesivos deletéreos (Lande y Porcher, 2017). Si bien no hay una limitación para que los tubos polínicos lleguen al ovario e incluso fecunden al óvulo, comúnmente el desarrollo del cigoto o el embrión es interrumpido, o puede limitarse la germinación o incluso en la fertilidad de los individuos maduros (Lande y Schemske, 1985; Charlesworth y Charlesworth, 1987).

Los sistemas de apareamiento reflejan barreras reproductivas que han evolucionado para limitar la autofecundación (Goldber e Igić, 2012). Pueden expresarse como separaciones espaciales, en el que los verticilos sexuales se desarrollen a diferente longitud, lo que se conoce como hercogamia; puede ser una hercogamia simple, donde todas las flores son homogéneas en cuanto a la longitud de estambres y estigma, o bien este fenómeno se puede manifestar como diferentes morfos florales, donde hay al menos dos tipos de individuos. También puede darse el caso de que exista una curvatura en el pistilo que favorezca la polinización por otras flores (enantiofilia) (Simpson, 2006). Por otro lado, existen barreras temporales donde alguno de los dos verticilos sexuales madure primero (dicogamia), ya sea el gineceo (protoginia) o el androceo (protandria) (Batygina, 2019). Tanto la hercogamia y la dicogamia influyen en la forma en que los individuos se reproducen entre sí, por lo que de ellos dependen los sistemas de cruce, los cuales se manifiestan en diferentes posibilidades para resultar en la fusión de gametos: autocruza y entrecruza.

Debido a que la hercogamia y la dicogamia no son suficientes para evitar el arribo de polen al estigma de la misma flor o de flores de diferentes especies, muchas especies han desarrollado adicionalmente mecanismos que permiten el reconocimiento y rechazo del polen propio o ajeno. La autoincompatibilidad (AI) es un mecanismo bioquímico genéticamente determinado de rechazo hacia el polen de la propia flor; se reconocen al menos dos tipos de sistemas de AI, que se clasifican según la zona en la que se detiene el crecimiento del tubo de polen o la germinación del polen (Kauffman *et al.*, 1992). La AI esporofítica, ocurre a nivel del estigma, el cual al reconocer polen genéticamente idéntico, impide la germinación de los granos de polen mediante la carencia de exudados requeridos para que los granos puedan germinar y desarrollar tubos polínicos; este tipo de incompatibilidad es inexistente en especies con estigmas húmedos. Por otro lado, la AI gametofítica evita el crecimiento de tubos

polínicos y la liberación de los gametos a lo largo del estilo por medio de reconocimiento químico, lo que puede iniciar mecanismos consistentes en RNA'asas o glicoproteínas-S; este tipo de AI, se ha descrito bien en las familias Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae (Franklin-Tong y Franklin, 2003; Franklin-Tong, 2008).

Otra estrategia que limita la autofecundación o la fecundación entre especies diferentes es la autoincompatibilidad tardía (LSI, por sus siglas en inglés: Late Self-Incompatibility), que corresponde a la ausencia de desarrollo de las semillas por incompatibilidad genética (Finatto *et al.*, 2011; Hao y Zhao, 2011). Este es un mecanismo genéticamente dirigido por un número limitado de genes que actúa durante la fecundación o en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Gibbs, 2014). A estas características se le pueden sumar otras cuatro situaciones que ayudan a definir la LSI: 1) Los tubos polínicos crecen normalmente pero no ingresan a los óvulos, 2) Los tubos polínicos pueden ingresar a los óvulos, pero se detienen en el micrópilo o la nucela, 3) Los tubos polínicos no descargan las células espermáticas, 4) La fecundación puede ocurrir, pero la embriogénesis no se completa (Júnior, 2017)

Debido a la dificultad para distinguir entre LSI y depresión endogámica, se han propuesto tres criterios para establecer sus limitaciones (Lipow y Wyatt, 2000):

1) Las semillas afectadas por LSI, abortan en una sola etapa de manera uniforme, debido a que es una acción genéticamente controlada, mientras que las semillas afectadas por depresión endogámica abortan de forma variable a lo largo del tiempo, ya que los genes letales expresados se pueden encontrar en diferentes loci (Sage *et al.*, 1994).

2) No hay casos documentados donde la depresión endogámica promueva la autoesterilidad total en las poblaciones, sin embargo, puede darse el caso de que algunos individuos afectados por este fenómeno sean autoestériles. Por su parte, con la LSI, la mayoría de los individuos o la totalidad dentro de una población son autoestériles (Seavey y Carter, 1994).

3) Si un conjunto de especies relacionadas entre sí, carecen de barreras precigóticas, entonces se trata de un sistema de LSI. Esto se debe a que las especies afectadas por depresión endogámica requieren de una expresión de muchos genes para determinar la autoesterilidad, lo que es poco probable de observar en especies relacionadas. Por otro lado, la LSI es un mecanismo controlado y conservado a nivel de familia (Lipow y Wyatt, 2000).

Potencial reproductivo

La producción de semillas formadas mediante los distintos sistemas de cruce permite reconocer el potencial éxito reproductivo de una especie (Camacho *et al.*, 2018); sin embargo, este índice se complementa con el potencial de reclutamiento para conocer la eficiencia reproductiva de una especie, ya que este último contempla el número de semillas viables, es decir, aquellas que son capaces de germinar y desarrollar plántulas (Rayachhetry *et al.*, 1998).

Hibridación en plantas

El entrecruzamiento interespecífico y la producción de descendencia ocurre comúnmente por la distribución sobrelapada de especies filogenéticamente emparentadas (Preston y Pearman, 2015). Este proceso tiene al menos tres consecuencias claras (Baack *et al.*, 2015): puede conducir al aislamiento reproductivo de los híbridos formados y por lo tanto a la especiación; a la ganancia de genes de forma recíproca entre los progenitores; o a la heterosis, también conocido como vigor híbrido. En las plantas, la hibridación desempeña un papel importante porque permite dirigir los cambios genéticos hacia eventos de especiación, ya que los híbridos resultantes, al formar poblaciones con diferencias genéticas respecto a sus progenitores, son capaces de aislarse reproductivamente (Rieseberg, 1997).

La hibridación es un fenómeno clave en la evolución de las plantas con flores, y se estima que un 30 a 70 % de las especies originan eventos de hibridación a lo largo de su historia filogenética; esto propicia el desarrollo de posibles nuevas especies gracias a la diversidad genética originada durante las cruces interespecíficas (Wendt *et al.*, 2001).

A pesar de las ventajas de la hibridación, la dispersión de las poblaciones híbridas es complicada debido a que con frecuencia alguno de los verticilos sexuales es estéril, ya sea como resultado del desarrollo incompleto del androceo o gineceo, o bien, la falla en el desarrollo de los gametofitos que no producen células viables como consecuencia de la alopoliploidía, o de la incompatibilidad citoplasmática o nuclear (Budar y Pelletier, 2001).

A pesar de los obstáculos reproductivos de los híbridos, estos forman la base de la agricultura, porque permiten aprovechar las mejores características de ambos progenitores, un fenómeno identificado como “vigor híbrido” o “heterosis”, lo que ha permitido la mejora de cultivos y plantas de ornato, por lo que se considera como un proceso de selección artificial eficiente (Van Tuyl y Lim, 2003).

Características de la familia Crassulaceae

La familia Crassulaceae se integra por aproximadamente 1400 especies clasificadas en 33 géneros, de los cuales cuatro destacan de forma comercial por el número de especies o por la importancia que tienen en los cultivares: *Sedum*, *Crassula*, *Echeveria* y *Kalanchoe* (Carrillo-Reyes *et al.*, 2009). Las especies de esta familia se catalogan como plantas suculentas debido a la capacidad de almacenar agua en forma de mucílago dentro de sus hojas, y al depósito de taninos en las células que constituyen la pared de los verticilos florales y el cuerpo primario, ambos relacionados con el crecimiento en ambientes con clima seco (Evert, 2006). Por otro lado, el metabolismo CAM (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas, por sus siglas en inglés: Crassulaceae Acid Metabolism), descrito en esta familia se asocia con la supervivencia dentro de climas áridos, ya que consiste en la fijación de dióxido de carbono durante la noche, en el momento en que la temperatura desciende y se puede perder menos agua durante el proceso (Bräutigam *et al.*, 2017).

Las especies de esta familia son cosmopolitas, sin embargo, la gran mayoría de estas se distribuyen en el hemisferio norte y el sur de África, especialmente en regiones áridas. Las formas de vida principales dentro de este grupo son herbáceas y arbustivas, caracterizadas por desarrollar flores hermafroditas y, rara vez, unisexuales (Xu y Deng, 2017). Los estudios sobre sistemas reproductivos dentro de la familia Crassulaceae son escasos y abarcan especies particulares; se ha observado que especies de los géneros *Kalanchoe*, *Graptopetalum*, *Crassula*, *Sedum*, *Echeveria* y *Kalanchoe* pueden reproducirse por autocruza (Parra-Tabla *et al.*, 1998; Herrera y Nassar, 2009) y que la mayoría de las especies pueden formar híbridos, incluso de forma intergenérica (Uhl *et al.*, 2005; Carrillo-Reyes *et al.*, 2009). En cuanto a la reproducción asexual, existen pocos registros donde la apomixis represente un medio efectivo para producir semillas en especies del género *Sedum* (Amano y Ohba, 1992); sin embargo, la reproducción vegetativa es un fenómeno que ocurre en la mayoría de especies en la familia (Guo *et al.*, 2015)

De acuerdo con Johri *et al.* (1992), el óvulo de las crasuláceas es anátropo, bitégmico y crasinucelado, mientras que la entrada del tubo polínico hacia los óvulos suele ser porógama, es decir, que ingresa por medio del micrópilo, lo que da lugar a la doble fertilización, a partir del cual se forma un endospermo de tipo celular.

A nivel genético, las crasuláceas han resultado difíciles de clasificar debido a que son taxones con números cromosómicos variables, incluso a nivel individual; además tienen una alta capacidad para formar híbridos, tanto en condiciones naturales como artificiales, lo que

no permite considerar y aplicar el concepto biológico de especie, y ha dificultado la obtención de árboles filogenéticos que expresen sus relaciones naturales (Carrillo-Reyes *et al.*, 2009).

El género *Echeveria*

Este género, conformado por alrededor de 140 especies, es un grupo exclusivo de América, y se distribuye naturalmente desde el sur de Estados Unidos hasta el noreste de Sudamérica; no obstante, el 83 % de las especies son endémicas de México (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Las poblaciones suelen ser pequeñas y encontrarse aisladas en regiones áridas y templadas (Uhl, 1992), las cuales moldean microambientes como parte del estrato herbáceo o arbustivo y participan en los procesos de formación del suelo y de nodricismo para plantas más pequeñas (Reyes-Santiago *et al.*, 2011). Debido a lo restringido de su distribución natural, a la pérdida de hábitat por cambio en el uso de suelo y a la extracción ilegal, un total de diez especies y variedades se encuentran actualmente en alguna categoría de riesgo de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Norma Oficial Mexicana-059-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-2010) (Cuadro 1). Aunado a lo anterior, se han identificado otras especies que no se contemplan en esta Norma, pero que su amenaza por sobrecolecta o cambio de uso de suelo, amerita su inclusión, tales como *E. agavoides*, *E. calderoniae*, *E. humilis*, *E. mondragoniana* (Pérez-Cálix, 2008; Reyes-Santiago y Brachet, 2009). Sin embargo, aún se carecen de estudios demográficos y reproductivos para la gran mayoría de las especies del género, por lo que se desconoce el estado actual de su hábitat y de sus poblaciones.

Cuadro 1. Especies mexicanas del género *Echeveria* clasificadas con alguna categoría de riesgo de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Especie	Categoría de protección
<i>Echeveria amphoralis</i>	Sujeta a protección especial
<i>Echeveria elegans</i>	En peligro de extinción
<i>Echeveria laui</i>	En peligro de extinción
<i>Echeveria longissima</i> var. <i>aztatlensis</i>	Amenazada
<i>Echeveria longissima</i> var. <i>longissima</i>	Amenazada
<i>Echeveria moranii</i> .	Sujeta a protección especial
<i>Echeveria purpusorum</i>	En peligro de extinción
<i>Echeveria setosa</i> var. <i>ciliata</i>	En peligro de extinción
<i>Echeveria setosa</i> var. <i>diminuta</i>	En peligro de extinción
<i>Echeveria setosa</i> var. <i>setosa</i>	En peligro de extinción

Importancia cultural

Antes de la llegada de los españoles, varios pueblos apreciaban la belleza de las especies de este género y además les atribuían propiedades medicinales, por ejemplo: el tallo floral de *E. rubromarginata* y de *E. gibbiflora* se utilizaba para saciar la sed cuando el agua era escasa, e incluso fueron utilizadas para disminuir la fiebre, tratar el dolor de cabeza y como antiséptico en heridas y llagas (Reyes-Santiago *et al.*, 2011). En la actualidad, es un grupo de plantas mundialmente reproducida, utilizada y aprovechada de forma ornamental, por la coloración llamativa de sus hojas y flores. En México se aprovechan para diseñar azoteas y paredes verdes, ya que al ser plantas resistentes a la sequía permiten el ahorro de agua por disminución de su riego, además de representar un menor esfuerzo en su mantenimiento; aún más importante es que representan un resguardo para plantas locales que pueden estar amenazadas, lo que permite preservarlas (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Morfología de las especies del género *Echeveria*

Las plantas del género *Echeveria* se caracterizan por desarrollar hojas suculentas agrupadas en rosetas (filotaxia espiralada) y por flores hermafroditas que desarrollan cinco unidades de cada verticilo, a excepción del androceo, que está constituido por 10 elementos (Eggl, 2012). Las rosetas se desarrollan a partir de tallos que pueden ser evidentes o acaulescentes, de las cuales emerge un escapo con inflorescencias que pueden ser de cuatro tipos: racimos, espigas, panículas y cincinnos (Reyes-Santiago *et al.*, 2018). Los granos de polen característicos del género *Echeveria* son tricolporados y esferoidales (Arreguín-Sánchez, *et al.*, 1990; Rodríguez-Rojas *et al.*, 2015).

Biología reproductiva del género *Echeveria*

Como en muchos miembros de la familia Crassulaceae, en el género *Echeveria* se ha reportado la presencia tanto de la reproducción sexual como la vegetativa, así como la formación de híbridos interespecíficos en condiciones artificiales (Eggl, 2012) y algunos híbridos naturales (Uhl, 1992).

En la monografía de Walther (1972), a partir de una revisión de individuos colectados en México, se propuso dividir el género en 14 series, la cual es a la fecha la base para las clasificaciones existentes. Se basó en características morfológicas de las hojas, el tallo, las brácteas y las flores, a partir de los cuales describieron 44 especies. Por otra parte, menciona que la producción de semillas por autopolinización no es frecuente, sin embargo, no se indicó en cuántas, ni en cuales especies se realizaron las cruces. Aunado a lo anterior, señala que

la mayoría presentan algún grado de incompatibilidad debido a una menor producción de semillas cuando se autopolinizan.

Por su parte, Parra-Tabla *et al.* (1993) analizaron la biología reproductiva y ecología de la polinización y dispersión de semillas en *E. gibbiflora* en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) en la Ciudad de México, donde compararon la producción de frutos y semillas por medio de geitonogamia, autocruza autónoma, entrecruza y polinización natural. Observaron que la geitonogamia es tan eficiente como la xenogamia, lo que sugirió que la especie es autocompatible y que no existe un efecto por depresión endogámica; sin embargo, existe una disminución de la producción de semillas por medio de autocruza autónoma, lo que significa que la presencia de polinizadores es necesaria.

En un trabajo posterior, Parra-Tabla *et al.* (1998) realizó pruebas de polinización asistida en *E. gibbiflora* y las comparó con una muestra de plantas polinizadas naturalmente a lo largo de la temporada de floración. De esta forma se observó que las plantas polinizadas manualmente producen un mayor amarre de frutos, además de un mayor porcentaje de semillas. Esto indicó que las flores además requieren de una cantidad mínima de polen.

Con respecto a la producción de híbridos en el género, Walther (1972), clasificó a *E. sayulensis* como un híbrido natural, debido a que es poliploide y a que desarrolla hojas con características intermedias entre la serie *Gibbiflorae* y serie *Secundae*. Posteriormente, mediante cruza artificiales, Uhl (1992) obtuvo híbridos a partir de *E. gibbiflora*, *E. pulvinata* y *E. pittieri*, mostró que los híbridos suelen ser poliploides debido a que proceden de progenitores con diferente número cromosómico.

Posteriormente, Uhl *et al.* (2005) exploró la capacidad de producir híbridos entre *E. rosea* y *E. pulvinata*, *E. setosa* y *E. coccinea* por medio de cruza realizadas en condiciones artificiales. Resalta que la capacidad de hibridar, de reproducirse por autocruza y vegetativamente, son características que dependen de la especie. Esta variabilidad en los sistemas de cruza son posibles dentro del género y pueden ser aprovechados con fines taxonómicos, comerciales, de manejo y conservación.

Otro aspecto que se ha analizado de la biología reproductiva en el género, ha sido la ecología de la polinización. Parra-Tabla *et al.* (1993), encontraron que en las poblaciones *in situ* de la REPSA de *E. gibbiflora*, la polinización es realizada por colibríes de la especie *Cynanths latirostris*; mientras que en Veracruz, se observó que *E. rosea*, es polinizada por *Lamprolaima rhami* e *Hylocharis leucotis* (Jimeno-Sevilla *et al.*, 2014).

Además de la reproducción sexual en el género, se ha reportado también la reproducción vegetativa en condiciones naturales, en especies como *E. elegans*, *E. gibbiflora*, *E. longissima*, *E. subsessilis* y *E. runyonii* (Raju y Mann, 1970; Martorell, 2007; Cabahug *et al.*, 2016), mediante la formación de rametos o “hijuelos”. Sin embargo, este fenómeno se repite constantemente a lo largo de todo el género, ante condiciones adversas en el ambiente, como consecuencia de la esterilidad o ante la limitación de recursos como el polen (Parra-Tabla *et al.*, 1998; Herben *et al.*, 2017); aún así, no está reportado para las especie *E. strictiflora*, aunque sí es mencionado para *E. subalpina* (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

La reproducción de las especies se asocia con los números cromosómicos y el nivel de ploidía, donde las especies diploides tienden a una mayor flexibilidad de hibridación, mientras que las especies poliploides, probablemente producto de la hibridación, tienden a la reproducción vegetativa (Uhl, 1992). En el caso de *E. strictiflora*, el número cromosómico es $n= 12$, y exhibe tendencia a la poliploidía, mientras que *E. subalpina* presenta el número básico más extenso a lo largo del género, que es $n= 34$ y que se caracteriza en especies diploides (Uhl, 1992).

***Echeveria strictiflora* A. Gray**

Es una especie con distribución natural amplia que abarca los estados de Texas en EEUU, Chihuahua, Nuevo León y Tamaulipas, en México (Naturalista 2019) (Figura 1). Son plantas perennes y acaulescentes con hojas glabras oblanceoladas o espatuladas agrupadas en rosetas, a partir de las cuales emergen escapos de hasta 45 cm de largo, en los que se desarrollan cincinnos con 10 a 15 flores de aproximadamente 1 cm de largo (Eason, 2018). Florecen entre marzo y mayo, con un pico de floración en abril (Figura 3a).

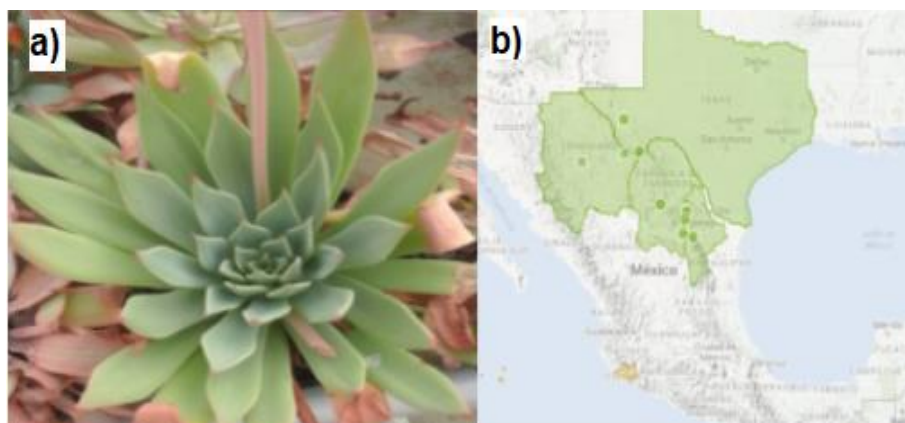


Figura 1. *Echeveria strictiflora*. a) Vista general; **b)** Distribución, que abarca desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de México (Naturalista, 2019).

***Echeveria subalpina* Rose & Purpus**

Es una planta perenne, glabra y acaulescente que posee un área de distribución restringida a Tlaxcala, noreste de Puebla y oeste de Veracruz (Jimeno-Sevilla, 2008) (Figura 2). Sus hojas con forma lanceolada u oblanceolada se agrupan en rosetas y las inflorescencias de tipo cincino se desarrollan a partir de un escapo de 20-30 cm de largo, en el que se forman de 8 a 20 flores de 8 mm de largo) (Eggl, 2012). Los botones florales tienen dos picos de desarrollo: marzo y mayo, al igual que hay dos picos de floración: mayo y octubre, lo que da lugar a un pico de fructificación en el mes de septiembre (Figura 3b).

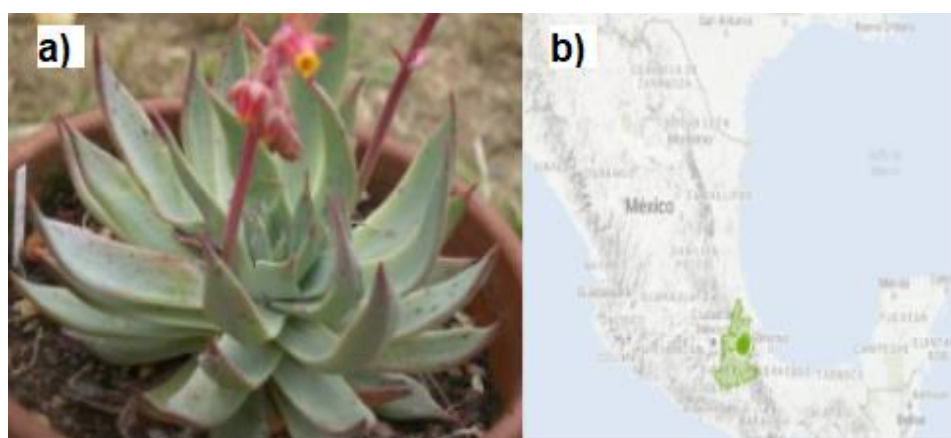


Figura 2. *Echeveria subalpina*. a) Vista general; b) Distribución, la cual se restringe a los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Naturalista, 2019).

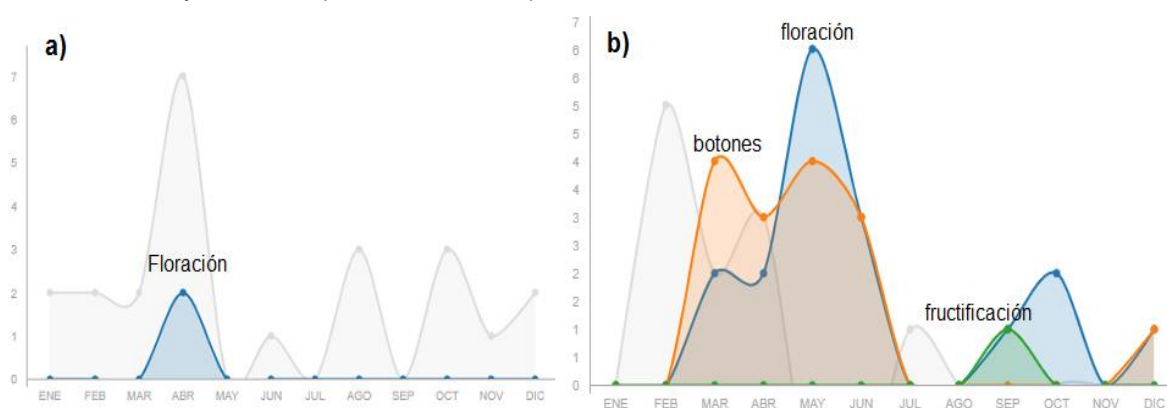


Figura 3. Fenología de a) *Echeveria strictiflora* y b) *Echeveria subalpina*, donde se muestran el número de observaciones de individuos con desarrollo de botones, floración y fructificación (Naturalista, 2019a, 2019b)

La especie *E. strictiflora* se incluye dentro de la serie *Angulatae*, mientras que *E. subalpina* se clasifica dentro de la serie *Secundae* (International Crassulaceae Network, 2019a, 2019b), los cuales son grupos emparentados filogenéticamente con la serie *Pruinose*, conformando un sólo grupo dentro del mismo clado. Esto permite suponer que existe la

posibilidad de lograr el entrecruzamiento artificial entre las dos especies (de la Cruz-López, 2018) (Figura 4).

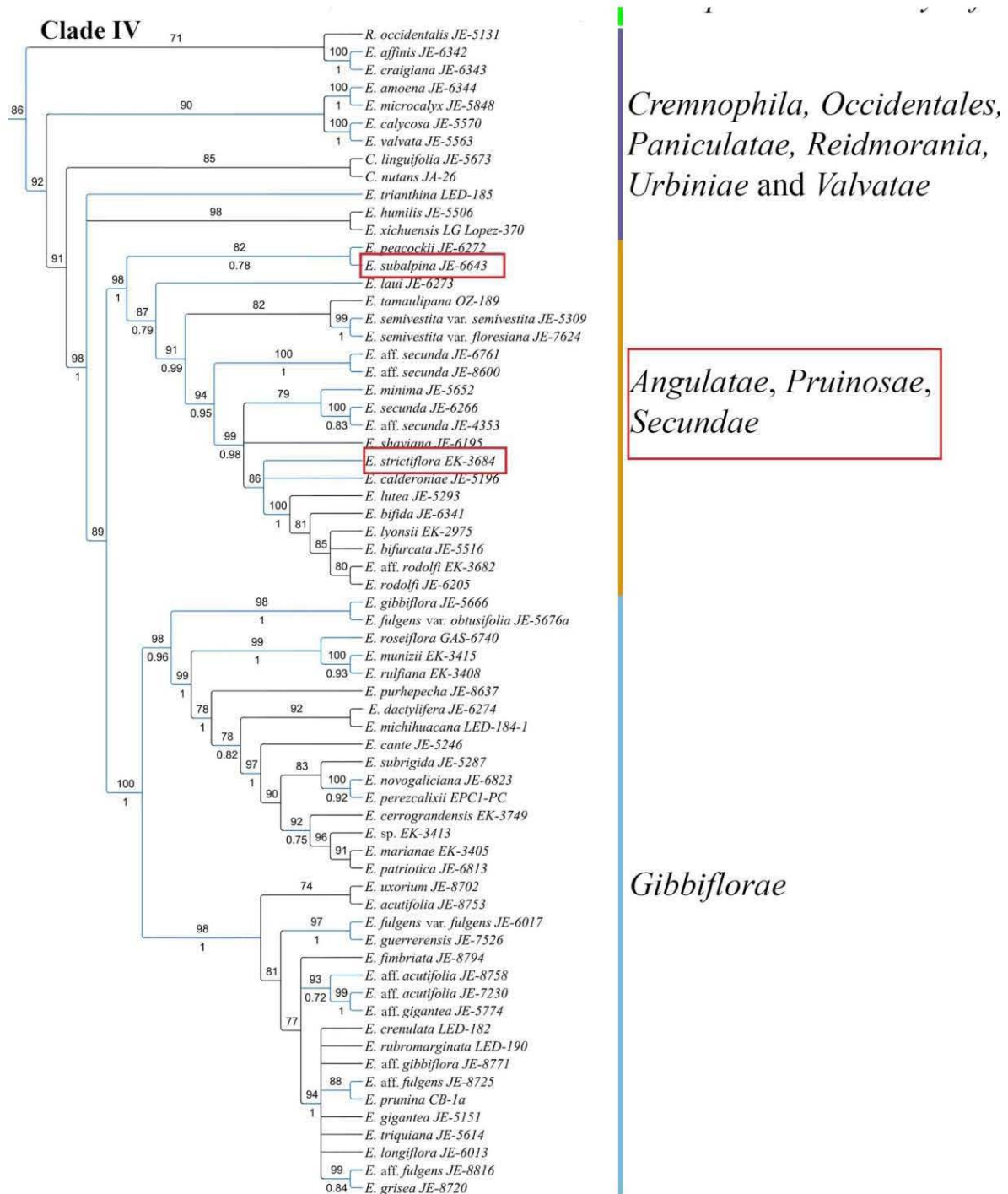


Figura 4. Filogenia del género *Echeveria*, donde se destaca la ubicación de *Echeveria strictiflora* y *Echeveria subalpina* en el mismo clado (de la Cruz-López, 2018).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Echeveria* es un grupo ampliamente representado en México, donde además se alberga una alta proporción de especies endémicas. El cambio de uso de suelo y el creciente interés por su comercialización ha incrementado la presión sobre sus poblaciones naturales. Debido a la dificultad de acceso a los ambientes naturales, así como a las duras condiciones climáticas bajo las cuales se desarrollan, son pocos los estudios que abordan los aspectos que mantienen o limitan su reproducción. Esta información es indispensable para conocer los estados de conservación, las relaciones ecológicas y establecer programas de manejo y aprovechamiento *in situ* y *ex situ*. Las especies *E. strictiflora* y la endémica *E. subalpina* tienen potencial para ser utilizadas en programas de propagación *ex situ* con fines comerciales. Ambas especies producen flores hermafroditas y por tanto tienen el potencial de autopolinizarse; sin embargo, no se ha determinado si presentan atributos que limiten la producción de semillas por autofecundación, y por tanto el reclutamiento de nuevos individuos.

JUSTIFICACIÓN

Los estudios de biología reproductiva dentro del género *Echeveria* son fundamentales para proveer información acerca de la conservación de las especies, ya que abordan los procesos que potencialmente favorecen o limitan el reclutamiento de nuevos individuos en una población. Así mismo, generan información que puede ser aplicada para planes de manejo, mejoramiento y aprovechamiento, para abastecer el creciente mercado y evitar así la extracción ilegal. Existe un interés por la propagación y posible comercialización de *E. strictiflora* y *E. subalpina*, debido a que son especies atractivas para ser plantadas en jardines, azoteas y paredes verdes. Por otra parte, debido a que comparten períodos de floración, tienen el potencial de producir híbridos a través de los cuales se pueden introducir características novedosas de interés (por ejemplo, mayor resistencia a la sequía, reproducción vegetativa). Describir la biología reproductiva de estas especies, provee de un antecedente acerca de los atributos florales que influyen sobre la polinización, compatibilidad de polen, fecundación, producción de semillas, germinación, así como la posibilidad de producir híbridos.

HIPÓTESIS

Si *E. strictiflora* y *E. subalpina* son hermafroditas, entonces presentarán atributos florales que favorezcan la producción de semillas y el potencial de reclutamiento mediante autocruza.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Caracterizar y comparar la funcionalidad de los verticilos sexuales de *E. strictiflora* y *E. subalpina* para determinar los sistemas de cruce y de apareamiento de cada especie, así como la capacidad de formar híbridos.

Objetivos particulares:

- Identificar las características morfológicas de las flores de *E. strictiflora* y *E. subalpina*.
- Comparar la funcionalidad del androceo en *E. strictiflora* y *E. subalpina*.
- Comparar la funcionalidad del gineceo entre *E. strictiflora* y *E. subalpina*..
- Determinar los sistemas de cruce y de apareamiento de *E. strictiflora* y *E. subalpina* y su capacidad de producir híbridos.
- Evaluar la producción, viabilidad y vigor de las semillas producidas mediante cruces intra e interespecíficas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico: Se utilizaron diez individuos de *E. strictiflora* y diez individuos de *E. subalpina*, que se obtuvieron del invernadero que forma parte del proyecto de propagación de cactáceas y plantas suculentas de la colección viva del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Dichas plantas pertenecen a la primera generación, producida en invernadero a partir de las cruces de individuos colectados *in situ*, en las siguientes localidades:

- *Echeveria strictiflora:* Municipio de Ramos-Arizpe, Coahuila, 20 km al noreste de Saltillo rumbo a San José de los Nuncios, el 2 de diciembre de 2009 (25° 34' 34.5" N 100° 52' 9.5" W), Alt: 1374 msnm.

- *Echeveria subalpina*: Cerro Coyotepec, Puebla, km 70.5 de la carretera Cuapiaxtla-Perote, el 13 de mayo de 2014 (19° 26' 35.5" N 97° 35' 22.6" W), Alt: 2380 msnm.

Para facilitar el seguimiento de los botones florales y su descripción, el desarrollo se dividió en nueve etapas. Las etapas 1 a 5 se definieron de acuerdo al tamaño del botón en la etapa de preantesis. Por su parte, las etapas 6 a 9 se determinaron por el nivel de apertura de la corola (botón preantesis de etapa 5 con la corola cerrada; antesis temprana cuando inicia la apertura de la corola pero no ha alcanzado su apertura máxima; antesis franca con corola en apertura máxima; y antesis tardía, cuando ha ocurrido la mayor parte de la dispersión del polen y la corola empieza a senescer), así como por la presencia de polen libre debido a la dehiscencia de las anteras (Cuadro 2):

Cuadro 2. Clasificación de las etapas del desarrollo floral de *Echeveria strictiflora* y *Echeveria subalpina* de acuerdo con el tamaño promedio de los botones y apertura de la corola en las flores.

Etapa	Descripción	<i>Echeveria strictiflora</i>		<i>Echeveria subalpina</i>	
		Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
1	Botón	1	0.4	0.6	0.5
2	Botón	4	1	2.5	2.2
3	Botón	10	2	5.5	5.2
4	Botón	20	2.8	8.7	8.3
5	Botón	25	3.6	11.2	11
		<i>Echeveria strictiflora</i>		<i>Echeveria subalpina</i>	
Descripción		Polen liberado	Nivel de apertura de la corola	Polen liberado	Nivel de apertura de la corola
6	Botón preantesis	No	Cerrado	No	Cerrado
7	Antesis temprana	No	Semiabierto	Sí	Semiabierto
8	Antesis franca	Sí	Abierto	Sí	Abierto
9	Antesis tardía	Sí	Semicerrado	Sí	Semicerrado

Observación macroscópica de las flores

Se caracterizaron los verticilos florales: cáliz, corola, androceo y gineceo, con el fin de conocer el número de elementos, organización de los verticilos sexuales y tipo de placentación. Posteriormente se midió la longitud de los pistilos y los estambres para determinar si existe una separación espacial (hercogamia).

Funcionalidad del androceo

- *Observación morfológica del polen*: se observaron los granos de polen de diez estambres de *E. strictiflora* y diez estambres de *E. subalpina* en un microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol JSM-5310, a partir del cual se procesaron las

imágenes con el programa Orion-Jeol con el fin de identificar el tipo de abertura, tamaño y ornamentación.

- *Viabilidad del polen.* Se estimó el porcentaje de viabilidad de los granos de polen por medio de la tinción de Alexander, de acuerdo con el protocolo descrito por Márquez-Guzmán *et al.* (2016). Por medio de microscopio óptico, se cuantificó el polen viable teñido de color magenta del número total de granos de polen presentes en 10 campos.
- *Cuantificación del polen.* Se colectaron las anteras de diez flores de *E. strictiflora* y diez flores de *E. subalpina* durante la etapa de pre-antesis, es decir, cuando los botones están semiabiertos, previamente a la apertura total de las flores que expone los verticilos sexuales. Los estambres se maceraron suavemente en 500 μ L de agua bidestilada para liberar los granos de polen y se adicionó con detergente en polvo comercial para romper la tensión superficial como lo indican Márquez-Guzmán *et al.* (2016). Posteriormente, se colocaron 100 μ L en cámara de Neubauer y se contabilizó el número de granos de polen. El conteo se realizó tres veces y el valor promedio se multiplicó por cinco para estimar el número total de granos de polen por flor.
- *Crecimiento de los tubos polínicos:* Se polinizaron dos flores en la etapa de pre-antesis para cada uno de los siguientes tratamientos: autocruza y entrecruza. A las 36 horas después de la polinización se colectaron las flores y se conservaron sólo los pistilos; se fijaron en una solución de etanol y ácido acético glacial (3:1). Un día previo a la observación de los tubos polínicos, los pistilos se incubaron en metabisulfito de sodio 0.5 N y se pusieron en baño de María durante 60 minutos a una temperatura de 80 °C; una vez pasado ese tiempo, los pistilos se sumergieron en azul de anilina y se almacenaron en oscuridad a 4 °C durante toda la noche. El día de la observación, se separaron los carpelos y se realizó un “squash” con un cubreobjetos sobre un portaobjetos. La observación de los tubos polínicos se realizó en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, en un microscopio Olympus-Provis modelo AX70. Las fotomicrografías se tomaron con un sistema Evolution MP.

Funcionalidad del gineceo

- *Observación morfológica del gineceo:* se observaron cinco estigmas, estilos y cámaras ováricas para cada una de las especies (*E. strictiflora* y *E. subalpina*) en MEB con un equipo Jeol JSM-5310. Las imágenes se procesaron con el programa Orion-Jeol, con el fin de identificar papilas estigmáticas, constitución del estilo, pared del ovario, placentación y tipo de óvulo.

- *Receptividad del estigma*: Se agregó peróxido de hidrógeno al 8% a los estigmas de diez flores por cada una de las etapas, de las cuales se consideraron solamente las etapas 6 a la 9. Sumando un total de 40 flores evaluadas por especie. La receptividad del estigma fue evaluada semicuantitativamente del 0 al 3 de acuerdo con el burbujeo con peróxido de hidrogeno (donde cero indica la ausencia de burbujeo y 3 es la mayor intensidad de burbujeo), para reconocer en qué etapa de la antesis se presenta mayor receptividad del gineceo y compararlo con la maduración de las anteras, a fin de identificar en ambas especies la presencia de homogamia o dicogamia.
- *Número de óvulos*. Se contaron los óvulos de diez flores de *E. strictiflora* y diez flores de *E. subalpina*. Se separó uno de los carpelos del pistilo de cada flor y se contabilizó el número total de óvulos con ayuda de un microscopio estereoscópico Zeiss, modelo Stemi DV4 para estimar el número total de óvulos por flor, el valor obtenido se multiplicó por cinco (número de carpelos en las flores) para obtener el número de óvulos promedio por cada flor.

Evaluación del sistema reproductivo

Se realizaron los siguientes tratamientos de cruce en 20 flores por tratamiento (apomixis, autocruza autógena, autocruza asistida, geitonogamia, cruce intraespecífica, cruce interespecífica) distribuidas en diez plantas de *E. strictiflora*, la misma cantidad de flores fueron contempladas en *E. subalpina*. Para cada tratamiento, se colectaron los frutos al inicio de la apertura de los lóculos de la cápsula (aproximadamente 23 días postpolinización para *E. subalpina* y 49 días para *E. strictiflora*).

- 1) Apomixis: Se emascularon cinco flores pre-antesis de cada especie y se cubrieron con bolsas de tul de 4x3 cm durante el período completo de floración hasta la maduración del fruto.
- 2) Autocruza autónoma: se cubrieron los botones florales con bolsas de tul de 4x3 cm, en este caso, sin haber sido intervenidas con polinización manual.
- 3) Autocruza asistida: Se cubrieron botones preantesis con bolsas de tul de 4x3 cm y se esperó tres días hasta la etapa de antesis, posteriormente se descubrieron para transferir polen de la misma flor al estigma. Se cubrieron de nuevo y se esperó hasta la colecta del fruto.

4) Geitonogamia: Cada flor se emasculó y se cubrió con bolsas de tul de 4x3 cm, para evitar la llegada de polen externo. Después de tres días se polinizó la flor con polen proveniente de otra flor del mismo individuo. Se cubrió nuevamente la flor hasta la colecta del fruto.

5) Entrecruza asistida (polinización cruzada intraespecífica): Se emasclaron botones preantesis y se cubrieron con bolsas de tul 4x3 cm. Después de tres días, en antesis, se transfirió polen de un individuo distinto a los estigmas de las flores emasculadas. Las flores se cubrieron nuevamente hasta la colecta del fruto.

6) Polinización interespecífica asistida: De ambas especies se emasclaron botones preantesis y se cubrieron con bolsas de tul 4x3 cm. Después de tres días, en antesis, se realizaron cruza recíprocas, utilizando polen de la especie alterna. Las flores se cubrieron nuevamente hasta la colecta del fruto.

Capacidad germinativa de las semillas

Se utilizaron cinco frutos de cada tratamiento de cruza y a partir de cada fruto se sembraron tres repeticiones con 100 semillas cada una, en medio MS al 50 %. Cada dos días se registró el número de semillas germinadas por un período de 45 días. Se evaluó el porcentaje de germinación final (número de semillas germinadas/total de semillas sembradas x 100), así como la velocidad de germinación mediante la siguiente fórmula t_{50} (Saatkamp *et al.*, 2011):

$$t_{50} = t_i + (t_j - t_i) \times (N/2 - n_i) / (n_j - n_i)$$

Donde t_i se refiere al primer día de conteo; t_j se refiere al último día de conteo; N , se refiere al total de semillas germinadas; n_i es el número de semillas germinadas en el primer conteo y n_j se refiere al número de semillas germinadas según el último conteo.

Eficiencia de producción de semillas y potencial de reclutamiento

Se calculó la eficiencia de producción de semillas (Sef) a partir de la división del número de semillas maduras (NDS) entre el número promedio de óvulos por ovario (SPP). Por lo que la fórmula empleada fue la siguiente:

$$Sef = NDS / SPP$$

Por otro lado, se calculó el potencial de reclutamiento (PR) como un porcentaje que representa el número de plántulas a partir del número de óvulos por ovario. Para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$PR = (SM \times 100 / NPO) (PG/100)$$

Dónde SM indica el número promedio de semillas maduras por tratamiento, NPO al número promedio de óvulos por flor y PG al porcentaje de germinación. Esta fórmula puede abreviarse como la eficiencia de producción de semillas (Sef) multiplicada por la forma decimal del porcentaje de germinación.

Índices del sistema reproductivo

Se utilizó el índice de entrecruza (OCI) propuesto por Cruden (1977), para determinar el tipo de sistema de apareamiento presente en ambas especies. Dicho índice se obtuvo a partir de la apertura de la corola, maduración y la separación espacial entre las anteras y el estigma (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características florales cualitativas y cuantitativas utilizadas para identificar el sistema de apareamiento de las especies. Adaptado de Cruden (1977).

Abertura de la corola	Maduración	Espacio
<1 mm=0	Homogamia/ protoginia=0	Con contacto entre estigma y anteras=0
1-2 mm=1	Protandria=1	Sin contacto=1
2-6 mm=2		
>6 mm=3		

Posteriormente se asignó el sistema de apareamiento a partir de los valores obtenidos con las características florales (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores del índice de entrecruza correspondientes a los distintos sistemas de apareamiento, los cuales fueron aplicados a cada uno de las especies. Adaptado de Cruden (1977).

Sistema de apareamiento	Valores del Índice de entrecruza (OCI)
Cleistogamia	0
Autogamia obligada	1
Autogamia facultativa	2
Xenogamia facultativa	3
Xenogamia	4

Así mismo, se utilizó la tasa de entrecruza y depresión endogámica. La tasa de entrecruza (t_e) permite conocer la tendencia del sistema de cruza de acuerdo con la cantidad de frutos y semillas producidos en los tratamientos de autopolinización y entrecruzamiento manual, usando la ecuación:

$$t_e = W_e / (W_e + W_a)$$

Donde W_e es el número de semillas obtenidas por entrecruza y W_a , el número de semillas por autocruza (Mandujano *et al.*, 2010).

Con los resultados de la autopolinización y entrecruzamiento manual se calculó la depresión por endogamia, usando la ecuación acumulativa que considera número de frutos y semillas producidos:

$$\delta = 1 - [(W_{sa} / W_{oa}) \times (W_{sb} / W_{ob})]$$

Donde 'a' es la fase de fruto y 'b' la fase de semilla (Husband y Schemske, 1996).

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov en las comparaciones de la longitud de estambres y pistilo, números de granos de polen, viabilidad de polen, número de óvulos, número de semillas maduras, tamaño de semillas, porcentaje y velocidad de germinación de las semillas. En caso de haber normalidad, se empleó la prueba de *t-student* para comparar dos muestras, y ANOVA para más de dos muestras. Cuando los datos no mostraron normalidad, se utilizaron los estadísticos de Mann-Whitney para comparar dos muestras, y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar más de dos muestras. Tanto las pruebas de normalidad como los estadísticos de prueba se realizaron con un 95 % de confianza en el programa STATISTICA V11.0

RESULTADOS

Caracterización morfológica de las flores

Las flores de *E. strictiflora* (Figura 5a) tienen corola tubular, formada por cinco pétalos rojizos-anaranjados con bordes amarillo brillante. Presentan cinco sépalos largos y succulentos de color verde rojizo, con inserción perpendicular con respecto a los pétalos. El tamaño de la flor en antesis es de 33 ± 3 mm de longitud, mientras que el diámetro del cáliz alcanza 4.2 ± 0.3 mm (Cuadro 5). Las flores son hermafroditas, y se observa la madurez del gineceo durante la etapa de antesis temprana (etapa 7) de acuerdo con la receptividad del

estigma. Mientras que la liberación del polen se observó hasta la etapa de antesis franca (etapa 8), donde las anteras se ven dehiscentes y llenas de polen, y las cámaras ováricas están llenas de óvulos. Las anteras se posicionan por encima del nivel del estigma, y las mediciones mostraron que esta diferencia fue significativa (Cuadro 6; Figura 6), por lo que las flores son hercógamas (*t pareada*: $t=11.38$; $p=0.00001$; $p<0.05$).

Por su parte, las flores de *E. subalpina* (figura 5b) tienen una coloración anaranjada menos brillante, con bordes amarillo pálido. El tamaño de la flor es menor que en *E. strictiflora* de 17.1 ± 2 mm (*t student* $t=28.1$; $p=0.0001$; $p<0.05$) y los sépalos son pequeños y menos succulentos que los sépalos en las flores de *E. strictiflora*. En antesis, el cáliz tiene un diámetro menor que en *E. strictiflora*, de 17 ± 0.2 mm (*Mann whitney*: $U=13$; $p=0.00094$; $p<0.05$). Las flores son hermafroditas y a diferencia de *E. strictiflora*, se observó que la maduración de ambos verticilos sexuales se expresó en la etapa de antesis temprana (etapa 7). Sus flores también son hercógamas, pero a diferencia *E. strictiflora*, las anteras se posicionan por debajo del nivel del estigma (*t pareada*: $t=7.69$; $p=0.00003$; $p<0.05$) (Cuadro 6; Figura 6).

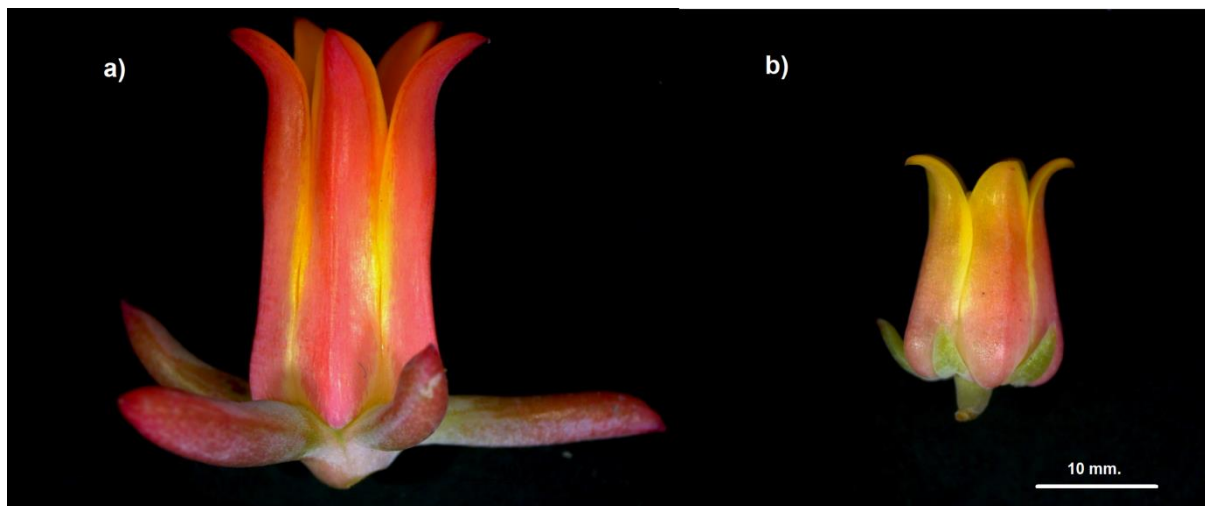


Figura 5. Flores en antesis de a) *Echeveria strictiflora*; b) *Echeveria subalpina*. Aumento de 1.2X. Se observan las diferencias cualitativas en el tamaño, tono y succulencia de los sépalos.

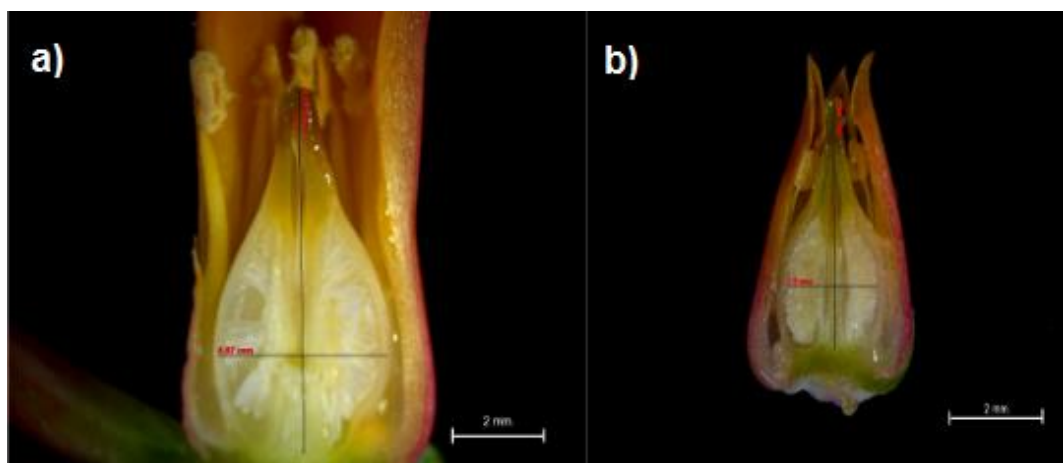


Figura 6. Cortes longitudinales de las flores en anthesis de a) *Echeveria strictiflora*; b) *Echeveria subalpina*. Aumento de 1.6X. Se observa la relación de longitud de los verticilos sexuales, el polen y las cámaras ováricas.

Cuadro 5. Características cuantificables correspondientes al tamaño de las flores y a la funcionalidad del androceo y el gineceo. Las letras en mayúscula representan diferencias entre diferentes especies y las letras en minúscula representan diferencias dentro de la misma especie.

	<i>Echeveria strictiflora</i>	<i>Echeveria subalpina</i>
Longitud de la flor (mm)	33 ± 3 A	17 ± 0.2 B
Apertura de la corola (mm)	4.2 ± 0.3 A	3.3 ± 0.3 B
Número de granos de polen	7900 ± 185 A	6900 ± 90 B
Viabilidad de polen (%)	75 ± 11.5 A	77 ± 6.4 A
Número de óvulos	715 ± 14.3 A	705 ± 13.2 A

Cuadro 6. Comparación del tamaño de la longitud entre una muestra de diez pistilos y 10 estambres para cada una de las especies.

	<i>Echeveria strictiflora</i>	<i>Echeveria subalpina</i>
Longitud de los estambres (mm)	0.82 ± 0.1 A	0.54 ± 0.2 A
Longitud del pistilo (mm)	0.78 ± 0.1 B	0.58 ± 0.2 B

Morfología del grano de polen

En *E. strictiflora* los granos de polen son esféricos, tricolpados con una ornamentación rugulada de la ectexina (Figura 7a y 7b), diámetro ecuatorial de 35±2 µm. Por su parte, el grano de polen de *E. subalpina* es esférico, tricolpado con una ornamentación psilada de la ectexina (Figura 7c y 7d). Su tamaño es similar, ya que su diámetro ecuatorial es de 35±1.5 µm. A diferencia de *E. strictiflora*, se observa que en *E. subalpina* el poro es más grande en relación con el colpo, y la membrana del poro es más laxa (Figura 7c-7d).

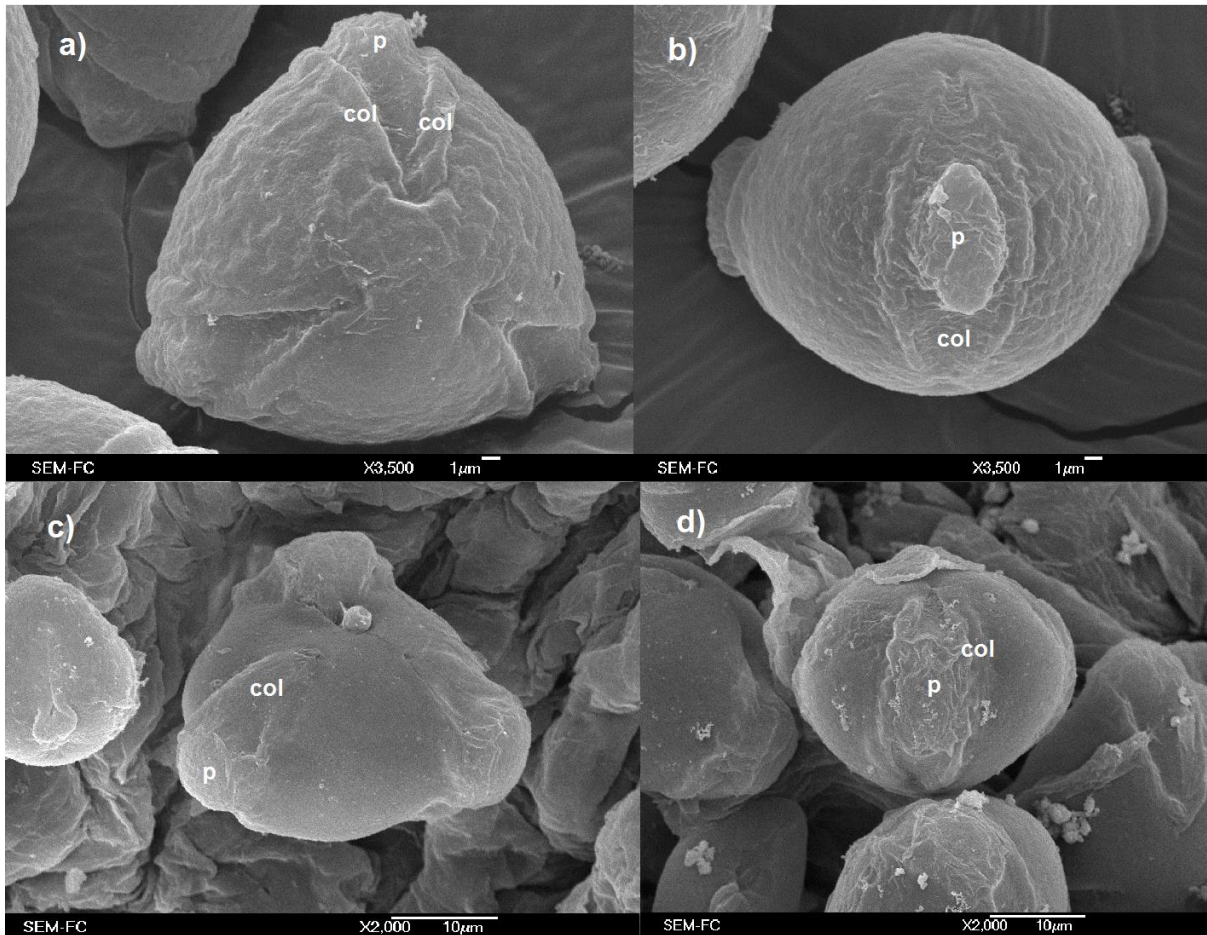


Figura 7. Morfología de granos de polen. *Echeveria strictiflora*: a) Vista polar d; b) Vista ecuatorial. *Echeveria subalpina*: c) Vista polar; b) Vista ecuatorial. p=poro; col=colpo.

Número de granos de polen y viabilidad

Tanto el conteo de granos de polen como la evaluación de su viabilidad fueron procesos útiles en la comparación de la funcionalidad de la parte masculina, como indicador de que los granos de polen son viables y tienen el potencial de ser donadores de gametos masculinos capaces de fecundar.

El número promedio de granos de polen fue mayor en *E. strictiflora* en comparación con *E. subalpina*, con aproximadamente 7 500 y 6 500 granos de polen (*t student*: $t=25.32$; $p=0.0001$; $p<0.05$), respectivamente (Cuadro 5). A pesar de la diferencia en el número, la viabilidad es similar para ambas especies, con un promedio cercano al 75% (*t student*: $t=1.346$; $p=0.194$; $p<0.05$).

Crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del pistilo

La observación del crecimiento de tubos polínicos a lo largo del pistilo se realizó con el fin de evaluar la posible existencia de un sistema de autoincompatibilidad, que impidiera el desarrollo de semillas por autopolinización. Transcurridas 36 horas postpolinización, tanto en

E. strictiflora como *E. subalpina*, se observó una gran cantidad de granos polen que germinaron en el estigma y tubos polínicos que crecieron a lo largo del estilo y llegaron hasta el ovario, tanto en la autocruza (Figura 8a-8c; 8g-8i), como en la entrecruza (Figura 8d-8f; 8j-8l), lo que indica que ambas especies son autocompatibles.

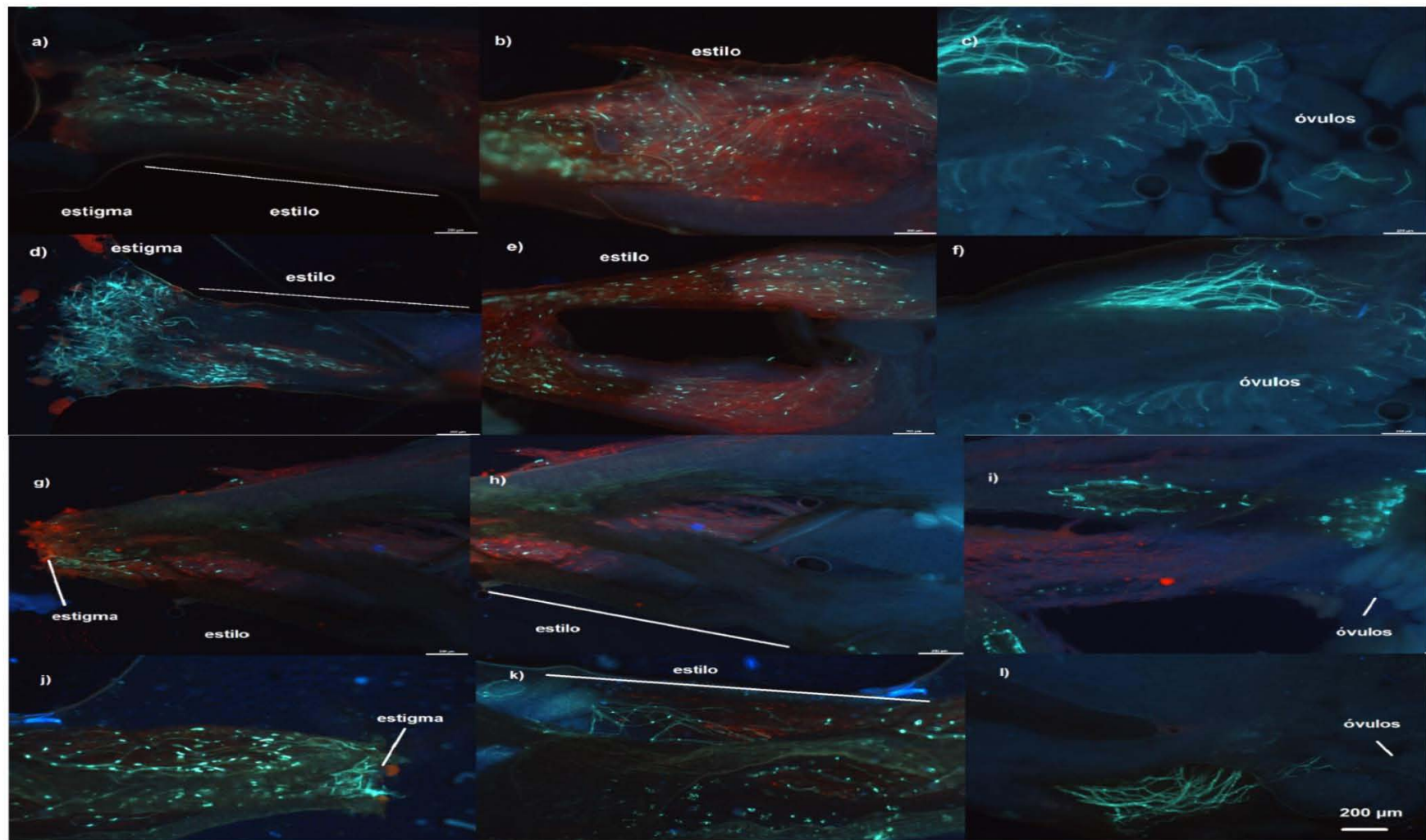


Figura 8. Observación de tubos polínicos a lo largo del pistilo en **a-c)** autocruza de *Echeveria strictiflora*; **d-f)** entrecruza de *Echeveria strictiflora*; **g-i)** autocruza de *Echeveria subalpina* **j-l)** entrecruza de *Echeveria subalpina*.

Morfología del gineceo

La observación de las estructuras femeninas fue útil para conocer detalles sobre la placentación y tipos de óvulos desarrollados en cada especie, lo que permitió comprobar información respecto a la estructura de las flores en las especies estudiadas e identificar posibles diferencias entre ambas para aportar información útil en su identificación y clasificación.

En *E. strictiflora* el estigma está compuesto por papilas estigmáticas pluricelulares y en el centro la entrada al canal estilar (Figura 9a-9b). El gineceo es apocárpico y está compuesto por cinco carpelos unidos a nivel del ovario (Figura 9c); al interior de cada carpelo la placentación parietal (marginal e intrusiva) y los óvulos son anátropos (Figura 9d-9e). La pared del ovario tiene una cutícula gruesa, una capa de células de la epidermis que contienen taninos y nueve capas de células que corresponden al parénquima mesofílico y una epidermis interna (Figura 9f).

En *E. subalpina* el estigma en anthesis también está compuesto por papilas estigmáticas pluricelulares, con células seriadas. El canal estilar al centro del estigma; aunque a diferencia de *E. strictiflora*, están recubiertas por una capa ligeramente brillante (Figura 10a-10b). El gineceo es apocárpico compuesto por cinco carpelos (10c), la placentación es parietal marginal intrusiva y los óvulos son anátropos (Figura 10d-10e); en esta especie se observa una cutícula más delgada que en *E. strictiflora*, sin embargo, las células de la epidermis se ven más grandes y con taninos, mientras que la región de parénquima es más delgada, compuesta por aproximadamente cinco capas de células y una epidermis interna delgada (Figura 10f).

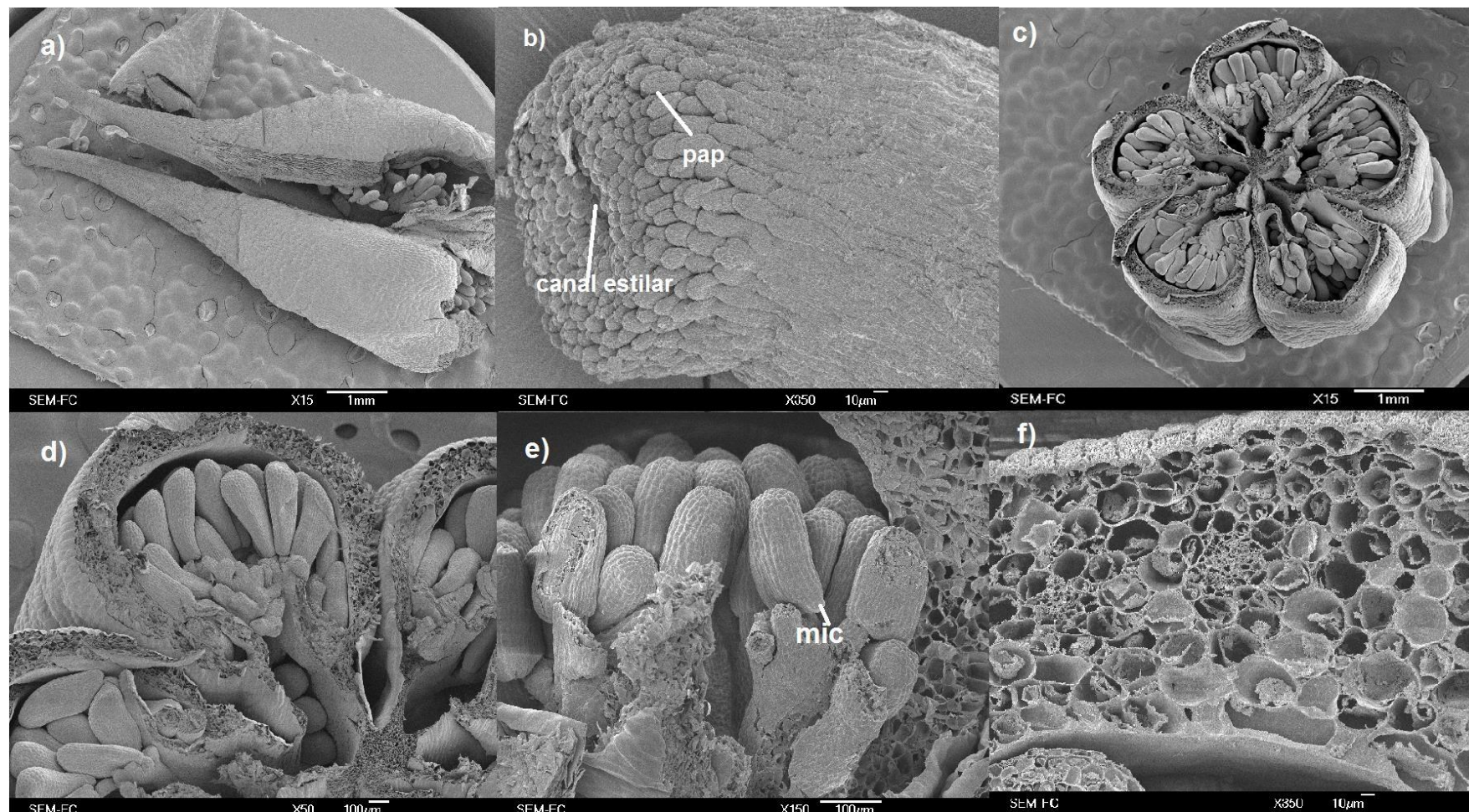


Figura 9. Pistilo, ovario y óvulos de *Echeveria strictiflora*. a) Vista panorámica del ovario; b) Vista panorámica de los carpelos; c) Gineceo apocárpico compuesto por cinco carpelos; d) Vista panorámica de un carpelo; e) Óvulos anátropos dentro de la cámara ovárica; f) Acercamiento de la pared del ovario. mic: micrópilo, pap: papilas estigmáticas.

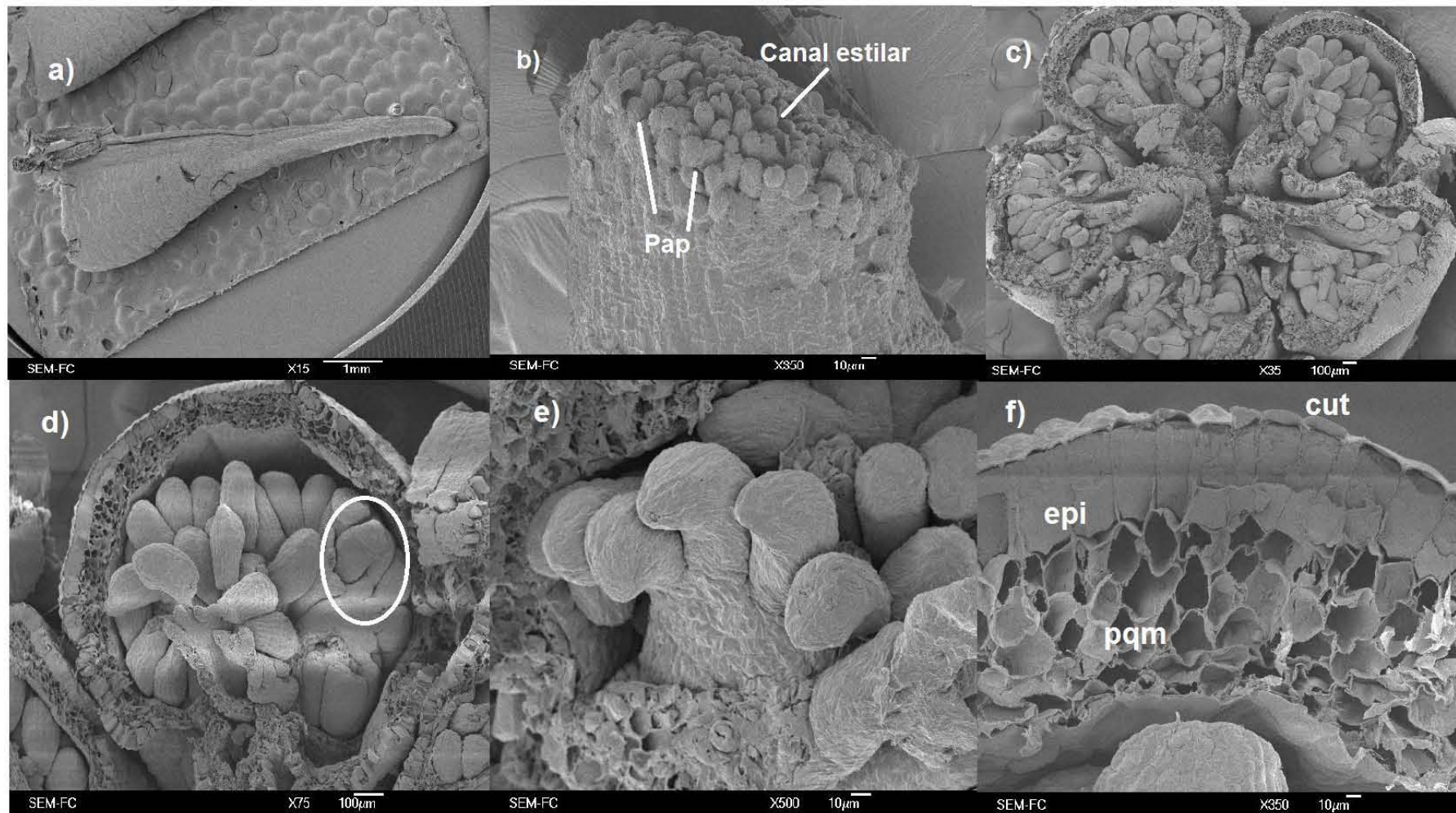


Figura 10. Pistilo, ovario y óvulos de *Echeveria subalpina*. a) Vista panorámica del ovario; b) Vista panorámica de los carpelos; c) Gineceo apocárpico compuesto por cinco carpelos; d) Vista panorámica de un carpelo; e) Óvulos anátropos dentro de la cámara ovárica; f) Acercamiento de la pared del ovario. mic: micrópilo, pap: papilas estigmáticas; mic: micrópilo, cut: cutícula, epi: epidermis, pqm: parénquima.

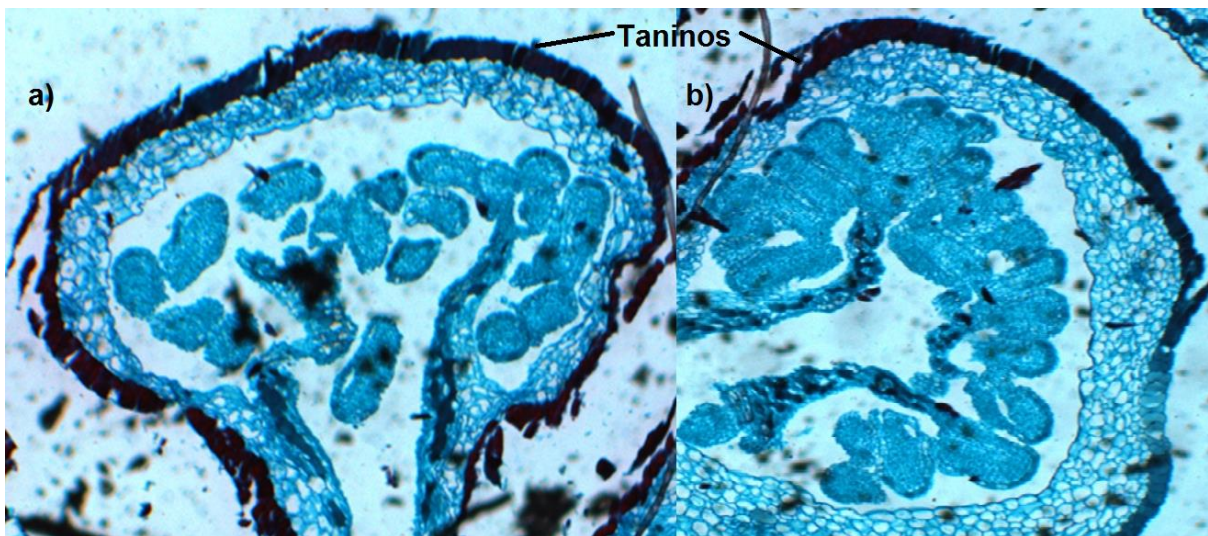


Figura 11. Corte transversal del ovario. a) *Echeveria strictiflora* y b) *Echeveria subalpina*, donde se observa la acumulación de taninos en la pared del ovario.

Receptividad del estigma

La receptividad del estigma se expresó desde la etapa de botón (etapa 6) en ambas especies, la cual aumentó hasta alcanzar su punto máximo en la etapa de antesis franca (etapa 8); posteriormente, se observó un descenso en la receptividad de la etapa de antesis tardía (etapa 9).

Liberación de polen

En *E. strictiflora* no se observó polen durante las etapas de botón y antesis temprana (etapas 6 y 7), hasta su liberación en la etapa de antesis franca (etapa 8); sin embargo, se reitera que el estigma se encuentra receptivo desde la etapa de botón (etapa 6), lo que indica que en esta especie hay protoginia. Así mismo, en *E. subalpina*, tampoco se observó polen durante las etapas de botón (etapas 6), aunque su liberación ocurrió en la etapa de antesis temprana (etapa 7). A pesar de que la receptividad del estigma se observó desde la etapa de botón (etapa 6), ambos verticilos se encuentran receptivos y funcionales en el momento en que la flor comienza a abrir, en la etapa de antesis temprana (etapa 7), lo que indica que en esta especie hay homogamia (Cuadro 7).

Cuadro 7. Receptividad del estigma comparada con la liberación de polen a través de las etapas de botón preantesis hasta antesis tardía.

	<i>E. strictiflora</i>		<i>E. subalpina</i>	
	Liberación de polen	Receptividad del estigma	Liberación de polen	Receptividad del estigma
Etapa 6 (Botón preantesis)	No	1.3±0.1	No	0.5±0.03
Etapa 7 (Antesis temprana)	No	2.1±0.05	Sí	2.1±0.1
Etapa 8 (Antesis franca)	Sí	3±0	Sí	2.9±0.05
Etapa 9 (Antesis tardía)	Poca	1.8±0.1	Poca	2±0.1

Número de óvulos

El conteo de óvulos se realizó con el fin de determinar la funcionalidad del gineceo de cada especie y posteriormente evaluar el potencial de producción de semillas por flor. Las flores de ambas especies produjeron en promedio 700 óvulos y no se observaron diferencias entre ellas (*t student*: $t=1.57$; $p=0.13$; $p<0.05$) (Cuadro 5).

Análisis de los sistemas reproductivos

Se evaluó la formación de frutos y semillas obtenidos en los distintos tipos de cruza (Cuadro 8):

Apomixis: Las flores se emascularon pre-antesis y luego se cubrieron a fin evaluar el potencial de formar semillas en ausencia de polinización. En ninguna de las especies se obtuvo la formación de frutos ni de semillas (Cuadro 8).

Autocruza autónoma: En este tratamiento, se dejó a las flores intactas para observar la formación de frutos en ausencia de posibles polinizadores. En ninguna de las especies se obtuvo la formación de frutos ni de semillas (Cuadro 8).

Autocruza asistida: En este caso, se autopolinizaron los estigmas con polen de su misma flor. En *E. strictiflora* se obtuvo el 100% de amarre de frutos con una producción promedio de 158 ± 24 semillas maduras, mientras hubo un 83.33 % de frutos en *E. subalpina* con una producción de 173 ± 27.4 semillas maduras. Se observó una

diferencia en el tiempo de desarrollo de frutos, ya que en *E. strictiflora* maduraron en 28 ± 2 días, mientras que los de *E. subalpina* maduraron en 21 ± 2 días (Cuadro 8).

Geitonogamia asistida: Este tratamiento consistió en transferir polen de una flor a otra dentro del mismo individuo. En *E. strictiflora* se obtuvo el 88.88% de amarre de frutos,

mientras el 100% en *E. subalpina*. Se observó que el tiempo de desarrollo de frutos en *E. strictiflora* es de 28 ± 2 días, mientras que los frutos de *E. subalpina* maduraron en 21 ± 2 días (Cuadro 8).

Entrecruza intraespecífica: En este tratamiento se transfirió el polen de una flor al estigma de otra flor perteneciente a otro individuo de la misma especie. El amarre de frutos fue del 100 % en ambas especies y la producción de semillas fue significativamente mayor que en la autocruza y geitonogamia. El número promedio de semillas por entrecruza intraespecífica fue de 374 semillas en *E. strictiflora* y de 371 semillas para *E. subalpina* (Cuadro 6). En este caso, el desarrollo de frutos fue 49 ± 3 días en *E. strictiflora* y de 25 ± 2 días *E. subalpina* (Cuadro 8).

Entrecruza interespecífica: En este tratamiento se transfirió el polen de una flor al estigma de otra flor perteneciente a un individuo de la especie alternativa. El amarre de frutos fue del 100 % en ambos sentidos de la cruz (es recíproca). La producción de semillas fue significativamente mayor que en la autocruza y geitonogamia, pero similar a la obtenida por entrecruza intraespecífica. Cuando *E. strictiflora* fue el receptor de polen, el número de semillas promedio fue de 360.2, y fue de 346 semillas cuando el receptor fue *E. subalpina*. El tiempo de maduración de los frutos por entrecruza interespecífica fue de 51 ± 2 días en *E. strictiflora* y de 27 ± 2 días *E. subalpina* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Cuadro comparativo de producción de frutos, semillas y potencial de regeneración en *Echeveria strictiflora* y *Echeveria subalpina*.

Cr: Número de cruza; TMF: Tiempo de Maduración de los Frutos; FT: Frutos Totales; ST: Semillas Totales; SM: Semillas maduras; PR: Potencial de Reclutamiento. Las letras en mayúscula indican la similitud o diferencia de los valores dentro de las especies, mientras que las letras en minúscula indican diferencias entre las especies. ANOVA; F=30.41, p<.05).

<i>Echeveria strictiflora</i>							<i>Echeveria subalpina</i>					
	Cr	TMF (Días)	FT	ST	SM	PR (%)	Cr	TMF (Días)	FT	ST	SM	PR (%)
Apomixis	20	28	0	0	0	0	20	21	0	0	0	0
Autogamia autónoma	20	28	0	0	0	0	20	21	0	0	0	0
Autocruza	20	28±2	20	506.6 ± 48.09 A a	158± 24 C c	10.35 E	20	21±2	20	523 ± 58 A a	173 ± 27.4 C c	13.34 E
Geitono-Gamia	20	28±2	20	493.6 ± 38.35 A a	177.4 ± 21.14 C c	12.57 E	20	21±2	20	516± 50.27 A a	165 ± 19.5 C c	13.87 E
Entrecruza intraespecífica	20	49±3	20	620.4±28.5 B b	374 ± 14.8 D d	35.06 F	20	25±2	20	639± 24.16 B b	371 ± 11 D d	35.41 F
Entrecruza interespecífica	20	51±2	20	615±26.45 B b	360.2 ± 19.72 D d	32.42 F	20	27±2	20	630 ± 18.7 B b	346±19.3 D d	33.48 F

Morfología de las semillas

Las semillas de *E. strictiflora* son reticuladas y reniformes, con un tamaño promedio de $829.23 \pm 40 \mu\text{m}$ de largo y $321.73 \pm 27.57 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 12a); por otro lado, las semillas de *E. subalpina*, aunque también son reticuladas, tienen forma ovoidal y su tamaño es menor, de $381 \pm 31.1 \mu\text{m}$ y $183 \pm 42.42 \mu\text{m}$ de largo y ancho, respectivamente (Figura 12b). A pesar de su tamaño diferente, ambas se encuentran dentro de la categoría de semillas “pequeñas” (Martin, 1946; Baskin y Baskin, 2007) caracterizadas por cubiertas de la semilla reticuladas y un tamaño entre 300 y $1200 \mu\text{m}$.

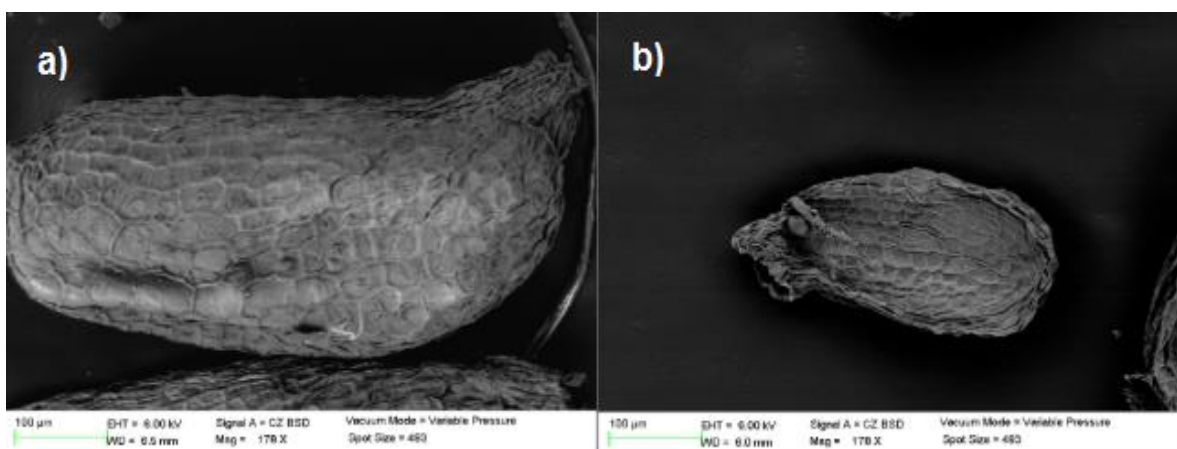


Figura 12. Comparación de las semillas de a) *Echeveria strictiflora* y b) *Echeveria subalpina*, observadas con un aumento de 128X. Se observa que ambas poseen una cubierta reticulada.

Porcentaje y velocidad de germinación

Se evaluó la capacidad germinativa para estimar la viabilidad de la semilla producida a partir de las distintas cruzas, lo cual permite también evidenciar el potencial que tienen los sistemas de cruce para el reclutamiento de nuevos individuos, incluyendo los híbridos.

El porcentaje de germinación de semillas de *E. strictiflora* obtenidas por autopolinización fue similar para autocruza y geitonogamia, con un promedio de 46 y 48 %, respectivamente. Así mismo, el tiempo de germinación fue similar, con un promedio de cuatro días. No se observaron diferencias con respecto a *E. subalpina* dado que el porcentaje de germinación en estas mismas condiciones fue de 50 y 49 %, aunque el tiempo de germinación inicial fue de siete días (Figura 13).

En contraste, el porcentaje de germinación de semillas de *E. strictiflora* obtenidas por autocruza intraespecífica e hibridación (en la cual la especie fungió como receptora de polen) tuvo un promedio de 70 y 66 %, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron para *E. subalpina*, donde el porcentaje de germinación en estas mismas condiciones fue de 71 y 67 %. Esto indica que la germinación con los tratamientos de entrecruza intraespecífica e hibridación fueron significativamente mayores que los tratamientos de autocruza y geitonogamia (ANOVA: $F=20.34$; $p=0.001$; $p<0.05$).

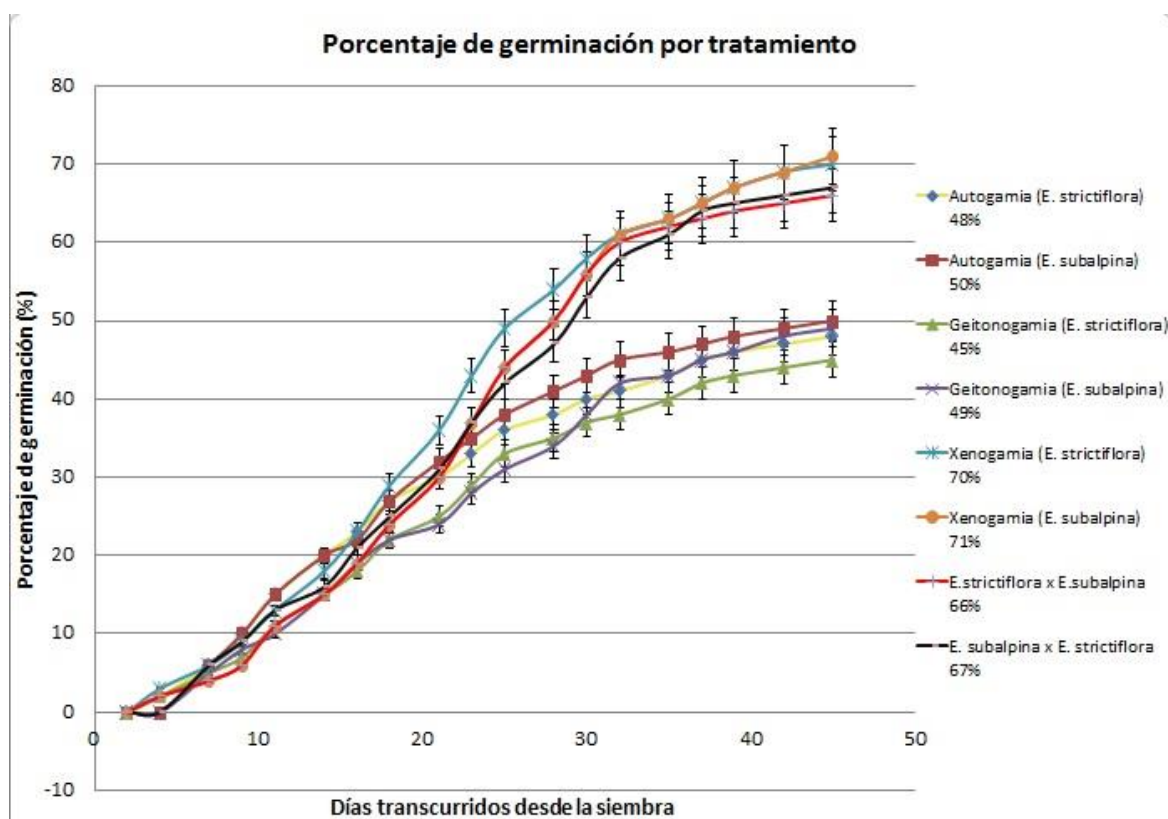


Figura 13. Comparación de los porcentajes de germinación entre los diferentes tratamientos de cruce y entre ambas especies. (ANOVA: $F=20.34$; $p=0.001$; $p<0.05$).

A pesar de las diferencias mencionadas, el cálculo de la t_{50} (días que tarda en alcanzar el 50 % de la germinación) para la velocidad germinativa de las semillas obtenidas varió entre 22.9 y 24.34 días, independientemente de la especie y el tipo de cruce se trata de una cifra similar, lo que muestra que la velocidad de germinación es similar en todos los tratamientos (ANOVA, $F=1.78$; $p=0.12$; $p<0.05$)-(Anexo 1).

Eficiencia de producción de semillas y potencial de reclutamiento

A partir del promedio de óvulos por flor, semillas llenas por fruto y porcentaje de germinación de semillas maduras, se estimó el potencial de producción de semillas y de regeneración. El potencial de producción de semillas en *E. strictiflora* para los tratamientos de autocruza y geitonogamia fue similar, de 22 y 24 %, respectivamente, lo cual fue significativamente menor que el potencial obtenido con entrecruza intraespecífica e hibridación que fue de 52 y 50 %. Se obtuvieron valores similares en *E. subalpina*, donde se estimó que este potencial es de (24 y 23 %) para los tratamientos de autocruza y geitonogamia, y de (52 y 49 %) para entrecruza intraespecífica e hibridación. Con lo cual se puede concluir que hay una mayor producción de semillas en eventos de polinización cruzada que por autopolinización.

El potencial de regeneración habla sobre el desarrollo de plántulas a partir del número de óvulos por cada flor. Del total de semillas maduras que se produjo en cada especie, aproximadamente el 50% logró germinar en las cruza autógamas, lo que representa una recuperación de 10.35 y 12.57% con los tratamientos de autogamia y geitonogamia en *E. strictiflora* y de 13.35 y 13.87% en *E. subalpina*. La recuperación en las cruza interespecíficas fue cercana al 70% y fue significativamente mayor que en las anteriores (ANOVA $F=30.41$, $p<.05$), lo que representa una recuperación en las cruza intra e interespecíficas del 35.06 y 32.42% en *E. strictiflora* y de 35.41 y 33.48% en *E. subalpina*.

Índices del sistema reproductivo

Con los datos de apertura de la corola, dicogamia y hercogama obtenidos se calcularon los índices de entrecruza (OCI), la tasa de entrecruza y del índice de depresión endogámica, para conocer el sistema reproductivo predominante en cada especie e identificar la presencia de un efecto por depresión endogámica en el caso de haber deficiencias en la producción de semillas en los tratamientos de autopolinización.

Tanto para *E. strictiflora* como *E. subalpina*, el OCI tuvo un valor de 3, lo que indica que son especies xenogamas facultativas; es decir, que si bien muestra preferencia por la entrecruza, es capaz de producir semillas viables mediante autopolinización. Esto se confirmó con el índice de la tasa de entrecruza, que fue de 0.705 y 0.668, respectivamente.

A pesar de lo anterior, se encontró un efecto por depresión endogámica, que pudo incidir sobre la producción de semillas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de OCI, tasa de entrecruza y de depresión endogámica de *Echeveria strictiflora* y *Echeveria subalpina*.

	OCI	Tasa de entrecruza	Índice de depresión endogámica
<i>E. strictiflora</i>	3	0.705	0.58
<i>E. subalpina</i>	3	0.668	0.54

Aunado al resultado anterior, los valores de depresión endogámica mayores a 0.5 indican que ambas especies sufren de un efecto por depresión endogámica.

DISCUSIÓN

En este trabajo se generó información acerca de la biología reproductiva de *E. strictiflora* y *E. subalpina*, lo cual aporta conocimiento sobre atributos florales que pueden ser de interés para la propagación de estas especies con fines comerciales y la producción de nuevas variedades, así como las limitaciones que pueden incidir sobre su reproducción. La información obtenida aquí puede ser valiosa para fortalecer las estrategias de manejo, aprovechamiento y propagación de ambas especies.

Biología floral

En este trabajo se caracterizaron algunos atributos de la morfología floral como la forma y tamaño de las flores, de los verticilos sexuales, así como características estructurales del grano de polen, los óvulos y las semillas. El principal objetivo fue conocer mejor el sistema de estudio y evidenciar diferencias morfológicas externas entre las especies que pudieran impactar sobre la funcionalidad de los verticilos, o representar una limitación para la fertilización; en particular, la observación de la existencia de hercogamia en *E. strictiflora* y *E. subalpina* es importante porque puede representar una barrera ante la autopolinización, lo cual proporciona información respecto a los sistemas de cruce en estas especies. Sin embargo, también fue posible reconocer características en el grano de polen que pudieran ser potencialmente diagnósticas para fines taxonómicos, aunque determinar su utilidad

como tal no fue parte de este trabajo. Conocer y caracterizar la biología floral es la base de conocimiento necesaria que permite evaluar potenciales caracteres adaptativos importantes para entender la distribución e interacciones de las especies (como la succulencia, el tamaño de las flores y la homógamia), las cuales pueden ser además aprovechadas por mejoradores y horticultores.

Morfología floral

En *E. strictiflora* las flores son hermafroditas, monostílicas, protóginas y hercógamas, mientras que en *E. subalpina*, las flores son hermafroditas, monostílicas, homógamas y hercógamas. Las flores de ambas especies difieren en el tamaño de todos sus verticilos, la cual es una proporción que se mantiene en el tamaño de los óvulos y las semillas, cuyo valor es mayor en *E. strictiflora*. Este tamaño mayor se ve reflejado también en la apertura de la corola, lo cual es indicador de que los polinizadores en el ambiente natural pueden ser de diferente tamaño o tomar diferentes estrategias para ingresar hasta los nectarios, lo que otorga información sobre sus posibles relaciones ecológicas (Herrera *et al.*, 2002). Sin embargo, dado que dentro del género *Echeveria* se han identificado colibríes como polinizadores de especies con flores grandes, como *E. gibbiflora* y *E. rosea* (Parra-Tabla *et al.*, 1993; Jimeno-Sevilla *et al.*, 2014) y mariposas y abejas como polinizadores de flores pequeñas como *E. coccinea* (Reyes-Santiago *et al.*, 2011), es muy probable que las flores de *E. strictiflora* y *E. subalpina* sean polinizadas por insectos. Debido a que el presente estudio se realizó en condiciones confinadas, fuera de sus áreas naturales de distribución, no fue posible comprobar cuáles son sus polinizadores.

Además del tamaño de las flores, se observó la diferencia en la succulencia de los sépalos, pétalos y el ovario, el cual es mayor en *E. strictiflora*. El principal factor que influye en este carácter puede ser el clima de sus hábitats, donde existe una relación entre los climas secos con una mayor acumulación de agua (Cushman, 2001). El clima en donde se desarrollan los individuos de *E. strictiflora* es semiárido cálido (Bsh)-(INEGI, 2017A), correspondiente al sur del municipio de Ramos-Arizpe. Los climas secos también se asocian con el desarrollo de cutículas gruesas, las cuales evitan la pérdida de agua por la impermeabilidad de la cutina (Hodson y Bryant, 2012). Por otro lado, las plantas de *E. subalpina* se crecen en el centro del municipio de Libres, caracterizado por un clima templado con lluvias en verano (Cw)-(INEGI, 2017B). En este caso se observó una cutícula más delgada, probablemente asociada a un mayor régimen de lluvias que en los ambientes

semiáridos y áridos donde habita *E strictiflora*.

Granos de polen

El grano de polen en *E. strictiflora* y *E. subalpina* son tricolpados y esféricos, lo que es congruente con las descripciones en otras especies del género *Echeveria* (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2015), y que a su vez, concuerda con el tipo de abertura y forma descritos en los géneros *Villadia* y *Sedum* (Arreguín-Sánchez *et al.*, 1990), los cuales en conjunto se clasifican dentro del clado Acre, por lo que puede ser considerado como un carácter taxonómico de este grupo (Carrillo-Reyes *et al.*, 2009). Por otra parte, la ornamentación de la exina es un carácter que varía entre las especies de crasuláceas y está ligado a las condiciones del ambiente en las que se desarrollan los individuos y sus síndromes de polinización, donde las ornamentaciones más lisas se transfieren por medios abióticos, mientras que las ornamentaciones construidas utilizan vectores bióticos (Kaiser *et al.*, 2015). Dentro del género *Echeveria*, la ornamentación del grano de polen varía dependiendo de la especie, donde *E. marianae* desarrolla polen escabrado (García-Ruiz y Costea, 2014) y *E. pistioides* se caracteriza por polen imperforado, escabrado (García-Ruiz *et al.* 2016). La diferencia en la ornamentación también caracteriza a estas especies, ya que la exina de *E. strictiflora* es rugulada y en *E. subalpina* es psilada, lo que implica el reconocimiento de posibles caracteres diagnóstico.

Óvulos

En el caso particular de los óvulos, los cortes histológicos y las observaciones con MEB revelan que son anátropos, bitégmicos y crasinucelados, características presentes en toda la familia Crassulaceae (Johri *et al.*, 1992). El número de óvulos desarrollados es abundante en ambas especies, lo cual concuerda con el rango de otros conteos realizados en otras especies, donde se documentó un promedio de hasta 900 óvulos por flor (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2015).

Se observó una diferencia en el tamaño de los óvulos entre ambas especies, siendo hasta tres veces más grandes en *E. strictiflora*, lo que se reflejó en el tamaño de las semillas, y permite deducir que en los híbridos, el tamaño de las semillas depende de cual sea la especie receptora de los granos de polen (progenitora femenina), ya que este tamaño está en función de los óvulos. A pesar de su diferencia, ambas son semillas “pequeñas”, que comparten la característica de cubierta (testa) reticulada (Martin, 1946).

Biología reproductiva

La mayoría de las plantas con flor son hermafroditas, por lo que tienen, en principio el potencial para auto-fertilizarse (Barret, 2002). Sin embargo, la proporción de semillas que se producen por auto-fertilización, o fertilización cruzada, varía notoriamente entre especies (Whitehead et al., 2018). El modo en el cual ocurre el apareamiento y los mecanismos que han evolucionado para mantenerlos, determinan no solo el genotipo de la progenie, sino también su potencial adecuación, por lo que impacta en el reclutamiento de nuevos individuos en una población. Hasta este trabajo, se tenían pocas referencias respecto a los factores que mantienen la reproducción en *E. strictiflora* y *E. subalpina*. Ambas son especies hermafroditas y se determinó que presentan un sistema de cruce mixto, lo cual significa que el reclutamiento de individuos puede ocurrir por autocruza y entrecruza. Aunado a lo anterior, son capaces de producir híbridos. Sin embargo, la polinización cruzada ofrece un mayor número de semillas vigorosas, lo que indica que para efectos de conservación, este sistema ofrece tanto mayor producción de semillas viables (tamaño efectivo de la población), como una mayor diversidad genética (Barrett y Harder, 2017), lo cual es ideal en poblaciones naturales debido a las condiciones cambiantes del ambiente. Esto es clave para comprender aspectos de estructura genética y demográfica, así como de adaptación local, especiación y extinción (Barret y Harder, 2017), que son la base para el establecimiento de estrategias de manejo y conservación.

El potencial de propagar a *E. strictiflora* y *E. subalpina* tanto por auto o entrecruza ofrece ventajas dependiendo del objetivo de los planes de propagación. Por un lado, se evidencia la necesidad de contar con una base genética amplia para mantener programas de propagación a largo plazo, ya que promueve una mayor adecuación tanto en las poblaciones naturales como en las poblaciones *ex situ* (Barrett y Harder, 2017). Por otra parte, por medio de la autocruza y la hibridación se permite establecer y perpetuar líneas genéticas, así como introducir nuevos caracteres (mayor resistencia a la sequía, la capacidad para reproducirse vegetativamente, combinaciones de colores en las flores), lo que tiene un fuerte impacto sobre planes de mejoramiento y desarrollo de variedades.

Sistemas de apareamiento

Los sistemas de apareamiento reflejan los mecanismos implicados en mantener o promover un sistema de cruce. En el caso de *E. strictiflora* se observó hercogamia inversa y

homogamia incompleta, mientras que en *E. subalpina* se observó hercogamia dinámica y homogamia.

Se encontró que las anteras de *E. strictiflora* y *E. subalpina* producen abundante polen con porcentajes de viabilidad similares, aunque el número es mayor en *E. strictiflora*, lo que puede representar un mayor potencial de polinización en esta especie. Sin embargo, una vez realizadas las cruces y al observar valores similares en cuanto a producción de semillas, con los mismos tratamientos entre diferentes especies, se descartó que exista una mayor eficiencia dependiente de la cantidad de granos de polen.

Se detectó hercogamia, la cual es inversa en *E. strictiflora* debido a que las anteras se encuentran por encima del estigma, mientras que en *E. subalpina* es dinámica porque las anteras inician debajo del estigma y aumentan su longitud durante la etapa de antesis hasta llegar al mismo nivel al final de la antesis (Opedal, 2018). En el caso de *E. strictiflora* se podría esperar que ocurra la autopolinización por gravedad y por viento, sin embargo; este proceso no se cumplió, ya que nunca se obtuvo la formación de frutos sin polinización asistida, debido posiblemente a la falta de una carga suficiente de polen que permitiera el desarrollo de los frutos (Parra-Tabla *et al.*, 1998). Por su parte, en *E. subalpina*, la posición de las anteras dificultó de manera efectiva la polinización a pesar de la homogamia en esta especie.

Las diferencias en el tamaño de los verticilos sexuales de ambas especies también pudiera representar una barrera precigótica para el entrecruzamiento interespecífico (hibridación (Tiffin *et al.*, 2001). En *E. strictiflora* el estilo es más largo, lo que podría dificultar el crecimiento de tubos polínicos de *E. subalpina* cuando actúa como especie receptora; sin embargo, se observó el crecimiento de tubos polínicos hasta el ovario y la producción de semilla viable. En ambas especies el grano de polen es de tamaño similar, lo que podría señalar hacia el desarrollo equivalente de la longitud de los tubos polínicos por una disposición equitativa de recursos para desarrollarse (Roulston *et al.*, 2000).

Además de la hercogamia, se determinó que la dehiscencia de las anteras y la receptividad del estigma se sobrelapan temporalmente durante la preantesis en *E. subalpina*, lo que significa que hay homogamia debido a que esa funcionalidad continua hasta la etapa post-antesis. El gineceo madura primero en *E. strictiflora* (protoginia),

aunque, ambos verticilos sexuales se mantienen viables y receptivos a lo largo de la antesis, por lo que esta diferencia temporal no representa una barrera contra la autopolinización. La receptividad del estigma se mantuvo en aumento hasta la antesis tardía, cuando decayó; esto pudo influir en la ausencia de autopolinización tardía (Jia y Tan, 2012), la cual pudo ser posible debido al contacto entre anteras y estigma al final de la antesis, lo que se observó en ambas especies, incluido *E. subalpina* que en un principio presenta hercogamia. Esto coincide con la disminución de polen disponible con el paso del tiempo durante la floración, por lo que una vez más se sugiere que la ausencia de frutos se debe a la falta de una carga suficiente de polen, de acuerdo con el principio de Bateman, en el que la adecuación del gineceo se encuentra limitada por la disponibilidad de polen (Burd, 1994; Parra-Tabla *et al.*, 1998).

Sistemas de cruza

Los distintos sistemas de cruza revelaron diferencias en la producción de semillas, la cual resultó ser más eficiente con entrecruza (tanto cruza intraespecíficas como interespecíficas) que con autocruza. Dentro de cada uno de los tratamientos de polinización, se expresan diferencias tanto en la producción de semillas y en la germinación:

Apomixis: no hubo formación de semillas en ninguna de las especies estudiadas, por lo que las semillas únicamente se desarrollan por vía sexual (Parra-Tabla *et al.*, 1998), lo cual se ha reportado para otras especies de *Echeveria*: *E. elegans*, *E. runyonii*, *E. agavoides*, *E. pumila* y *E. perle* (Rodríguez-Rojas, 2015). La reproducción por medio de este tratamiento no se ha observado en este género, sin embargo, dentro de la familia Crassulaceae se ha reportado dentro del género *Sedum* (Amano y Ohba, 1992).

Autocruza autónoma: la nula producción de semillas se debe a la presencia de hercogamia en ambas especies, sin embargo, en *E. strictiflora*, donde existe la posibilidad de polinizarse por gravedad o viento, no desarrolla semillas debido a la ausencia de los polinizadores, quienes deben proporcionar la carga mínima de polen para continuar con el desarrollo de un fruto (Parra-Tabla *et al.*, 1998); esto también se debe a que con el paso de las etapas florales, el estigma pierde receptividad y hay menos polen en las anteras, lo que evita la fecundación a pesar de que la flor compacta sus verticilos y las anteras y el estigma entran en contacto (Cuadro 5).

Autocruza asistida y geitonogamia: Con estos dos tratamientos se observó un potencial de regeneración de entre 10.35 y 13.87 %, lo cual es bajo con respecto al obtenido por cruza intra e interespecíficas. Esto indica un posible efecto por depresión endogámica, dada la baja producción de frutos y semillas (Husband y Schemske, 1996); lo último fue considerado más probable y relevante debido a la falta de un sistema de incompatibilidad, revelado a partir de la observación del crecimiento de tubos polínicos hasta el ovario (Figura 7-8). La presencia de autopolinización es característica de especies que se encuentran en el proceso de ocupación de nuevos nichos, ya que permite un reclutamiento rápido de individuos aún sin la visita de polinizadores (Barret, 2002).

Polinización intraespecífica: La producción de semillas con este sistema es mayor que con autocruza y geitonogamia, lo que concuerda con la tasa de entrecruza, que al tener un valor entre 0.2 y 0.8 significa que es un sistema reproductivo mixto, pero con tendencia a la entrecruza, al ser mayor a 0.5 (Mandujano *et al.*, 2010). Este resultado concuerda con las diferencias observadas, ya que si bien, ambas especies lograron reproducirse también por autopolinización, la mayor producción se inclina por la entrecruza, lo que es apoyado por el índice de depresión endogámica (Husband y Schemske, 1996).

Por su parte, la germinación, y por tanto el potencial de reclutamiento, se mantuvo proporcional y fue mayor en los tratamientos de entrecruza, como sucede en otras especies como *E. elegans* y *E. agavoides* (Rodríguez-Rojas, 2015). Esto muestra que la entrecruza, al disminuir las probabilidades de que los individuos emparentados se crucen entre sí, reduce el efecto de la depresión endogámica que se observó en estas dos especies, aun si el número inicial de plantas utilizado en este trabajo fue pequeño.

Es así como en *E. strictiflora* y *E. subalpina* se identificó un sistema de cruce mixto con tendencia a la entrecruza. Esta información es relevante para la propagación *ex situ*, ya que permite aprovechar una dualidad de cruce en ambas especies. En este caso la autocruza es útil para obtener varios individuos a partir de uno solo, lo cual es útil cuando se trata de especies que producen pocas flores por temporada, cuando la temporada de floración está por terminar o bien, cuando se inicia un proyecto de propagación con pocos individuos (Busch y Delph, 2012; Tang *et al.*, 2020). En el caso de la entrecruza, se observó la mayor producción de semillas viables, por lo que este proceso es recomendable cuando se tiene

una muestra de varios individuos.

En el caso de programas de conservación *in situ*, la autocruza es igualmente útil cuando se encuentran pocos individuos, afectados por la fragmentación de las poblaciones por cambio de uso de suelo o extracción ilegal (Tang *et al.*, 2020), aunque la entrecruza es el sistema de cruce preferente debido a la diversidad genética que conlleva. Para este tipo de trabajos se sugiere conocer la situación de conservación de cada una de las especies de estudio así como su hábitat y sus polinizadores.

Debido a la ausencia de frutos por medio de autocruza autónoma, se evidencia la importancia de conservar el hábitat donde crecen estas especies, ya que, para su reproducción sexual, estos requieren forzosamente de la intervención de los polinizadores. La conservación del hábitat permite mantener una mayor cantidad de individuos, lo que a su vez se refleja en la visita más frecuente de polinizadores y en una mayor probabilidad de entrecruzamiento (Kears e Inouye, 1997). Debido a que el trabajo se realizó *ex situ*, en condiciones confinadas y lejos de las áreas naturales de distribución de *E. strictiflora* y *E. subalpina*, no se abordó el estudio de polinizadores; sin embargo, su reconocimiento es importante para evaluar el estado de conservación de los polinizadores y el hábitat, la frecuencia de polinizadores, los síndromes de polinización y la eficiencia asociada a las relaciones que mantienen con cada especie (Frankel y Galun, 2012).

Sistemas de autoincompatibilidad

En todas las cruzas asistidas que se realizaron en este trabajo, para ambas especies, se obtuvo la formación de frutos y semillas. No obstante, el número de semillas en las autocruzas fue significativamente menor a las obtenidas mediante polinización cruzada intra o interespecífica. Debido a que se observó el crecimiento de tubos polínicos a lo largo del estilo hasta el ovario, se descarta la existencia de un sistema de incompatibilidad precigótico funcional, ya sea esporofítico o gametofítico (Franklin-Tong, 2008); sin embargo, es posible que se trate de mecanismos posteriores a la fecundación, como depresión endogámica o autoincompatibilidad tardía (LSI).

El índice de depresión endogámica indica que la disminución de la viabilidad en las semillas corresponde a un efecto por este fenómeno, sin embargo, los parámetros considerados para calcularlo no permiten distinguir las diferencias entre depresión

endogámica y LSI (Husband y Schemske, 1996). Por otro lado, los criterios establecidos para distinguir los límites entre ambas apoyan en su mayoría a un efecto por depresión endogámica, debido a que se ha observado que las poblaciones en estado natural no son autoestériles en su mayoría (Seavey y Carter, 1994; Parra-Tabla *et al.*, 1998), además que se caracteriza al género *Echeveria* como un grupo donde la autopolinización es frecuente, lo que coincide con el segundo criterio donde las especies relacionadas que son afectadas por LSI, son autoestériles en su mayoría (Walther, 1972; Lipow y Wyatt, 2000).

A pesar de los argumentos que apoyan la hipótesis de depresión endogámica, es evidente que en este trabajo no se realizó un seguimiento del desarrollo embrionario, el cual ayuda a delimitar de mejor manera la depresión endogámica y la LSI, ya que permitiría observar que el desarrollo de embriones afectados por LSI ocurre de forma uniforme en una misma etapa debido al control de pocos genes que existen por este mecanismo, mientras que el desarrollo afectado por depresión endogámica ocurre en etapas variables (Sage *et al.*, 1994).

Eficiencia de los sistemas de cruce

La eficiencia de producción de semillas se mantuvo superior en los tratamientos de entrecruza (polinización intraespecífica e interespecífica), que a su vez fueron proporcionales con los resultados se observan en el potencial de reclutamiento, lo cual representa la producción de semillas germinadas a partir del número inicial (óvulos) por cada sistema de cruce en condiciones *ex situ*. Evolutivamente se trata de especies con una divergencia reciente, en el que a pesar de desarrollar barreras reproductivas, son poco eficientes, los cuales aún permiten la hibridación y la autopolinización (Husband & Schemske, 1996).

Por otro lado, el porcentaje de germinación ofreció resultados similares en los tratamientos y entre especies, pero siguió siendo mayor en los tratamientos de entrecruza, lo cual puede deberse al efecto de depresión endogámica o LSI. Esta disminución en la germinación se ha observado en otras especies del género *Echeveria* como *E. elegans* o *E. runyonii* (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2015), por lo que si bien se ha observado su autocompatibilidad, existe un efecto que disminuye la viabilidad.

Hibridación entre *E. strictiflora* y *E. subalpina*

En este trabajo se analizó el potencial de obtener híbridos recíprocos entre *E. strictiflora* y *E. subalpina*. Los híbridos naturales son importantes evolutivamente ya que representan un mecanismo de especiación (Hegarty y Hiscock, 2005). En los estudios de biología reproductiva permiten conocer la compatibilidad de dos especies, producir nuevas variedades que aprovechen sus atributos y así como caracterizar los resultados fenotípicos de las cruzas entre dos especies diferentes (morfología, fisiología, fertilidad). Además, son la base de la horticultura debido a que partir de ellas es posible obtener nuevas variedades, o para introducir nuevos genes a las poblaciones de origen natural, mediante retrocruzas, lo cual implica un mejoramiento (Birchler, 2016). En el caso de *E. strictiflora* y *E. subalpina*, los híbridos nos ayudan a comprender la flexibilidad de hibridación que se reporta frecuentemente para la familia Crassulaceae, aun cuando se desarrollan en ambientes con climas diferentes (de la Cruz-López, 2018). Su posición filogenética dentro de un mismo clado indica que las especies pueden ser compatibles genéticamente debido a un proceso de divergencia reciente dentro de un contexto geológico (Vázquez-Cotero *et al.*, 2017; de la Cruz-López, 2018). Estos híbridos pueden ser aprovechados como variedades que expresan caracteres de sus progenitores que son deseables para las necesidades comerciales, como la resistencia a la sequía, mayor producción de frutos y semillas o cambios en los colores de las flores (Chen, 2010).

Mediante la polinización cruzada entre *E. strictiflora* y *E. subalpina* se produjo la formación de semillas viables independientemente de que especie fungió como receptora de polen. Esta reciprocidad muestra que no existe un mecanismo precigótico de rechazo al polen extraño entre estas especies y que la diferencia de tamaño entre los pistilos no representa una barrera para que el tubo polínico alcance a los óvulos y los fertilice. Se consideraba dado que ambas especies difieren en su número cromosómico, *E. subalpina*, tiene un número básico $N=34$, mientras que *E. strictiflora* es una especie diploide con número $N=12$, pudieran presentarse barreras post-cigóticas que limitaran la formación de semillas maduras. Sin embargo, fue notorio que el número de semillas viables formadas por hibridación, capaces de germinar, fue similar a lo obtenido por medio de la polinización cruzada intraespecífica, por lo que estas diferencias en número cromosómico tampoco representaron un mecanismo de aislamiento (o incompatibilidad), que detenga la maduración de la semilla ni las etapas tempranas del establecimiento de plántulas. Aunque

cabe señalar que se desconoce si los híbridos obtenidos presentan en etapas posteriores de su desarrollo alguna limitación o ventaja, o si su fertilidad es afectada.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que existe producción de semillas en todos los sistemas de cruza, por lo que no hay barreras para la reproducción. Sin embargo, notamos que la producción es menor con autocruza.

- *E. strictiflora* y *E. subalpina*, son dos especies con flores hermafroditas y hercógamas,
- En ambas especies se desarrollan flores protógamas incompletas.
- El androceo en ambas especies produce abundante polen, cuya cantidad es mayor en *E. strictiflora*, sin embargo, la viabilidad es similar.
- Los granos de polen son de tamaño similar, de forma esférica y tricolporados, pero difieren en la ornamentación, la cual es rugulada en *E. strictiflora* y psilada en *E. subalpina*.
- El gineceo es funcional en ambas especies, donde se comparte una cantidad similar de óvulos, los cuáles son anátropos, bitégmicos y crasinucelados.

Biología reproductiva

- La producción de semillas y su germinación dependen del sistema de cruza efectuado, el cual es mayor en los tratamientos de entrecruza..
- No existe un sistema de incompatibilidad, debido a que los tubos polínicos llegan hasta los óvulos en los tratamientos de autocruza.
- Existe un efecto por depresión endogámica que se refleja en una menor producción de semillas maduras y un menor porcentaje de germinación.
- La hibridación es recíproca, por lo que el tamaño de las flores no influye en la llegada de los tubos polínicos hasta los óvulos.
- Este trabajo representa un antecedente dentro de la caracterización floral y de la biología reproductiva de estas dos especies que puede servir como apoyo en la

reproducción de otras especies del género, especialmente a aquellas dentro de las series Angulatae y Secundae.

PERSPECTIVAS

La información generada en este trabajo sirve como un antecedente que puede dar paso a varios campos de estudio:

- 1) Caracterizar el desarrollo embriológico de las especies mediante los sistemas de autocruza y entrecruza para identificar las estructuras y etapas del desarrollo donde ocurre la muerte del cigoto, y determinar si la reducción en la viabilidad con el tratamiento de autocruza se debe a depresión endogámica o LSI.
- 2) Realizar estudios de biología reproductiva y ecología de la polinización *in situ* con el fin de identificar el estado de conservación de las poblaciones y las especies de polinizadores que permiten su reproducción.
- 3) Estudiar de atributos morfológicos y fisiológicos en híbridos, así como caracterizar su fertilidad para programas de mejoramiento.

LITERATURA CONSULTADA

- Amano, M., y Ohba, H. (1992). Biosystematic study of *Sedum* L. subgenus *Aizoon* (Crassulaceae). *The botanical magazine*. 105: 431-441.

- Arreguín-Sánchez, M. L., Palacios-Chávez, R. y Quiroz-García, D. L. (1990). Morfología de los granos de polen de los géneros *Echeveria*, *Sedum* y *Villadia* (Crassulaceae) del Valle de México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 3: 51-61.

- Baack, E., Melo, M. C., Rieseberg, L. H., y Ortiz-Barrientos, D. (2015). The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist*. 207: 968-984.

- Barrett, S. C. (2002). Evolution of sex: the evolution of plant sexual diversity. *Nature reviews genetics*. 3: 274.

- Barrett, S. C. (2003). Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 358:991-1004.

- Barrett, S. C. y Harder, L. D. (2017). The ecology of mating and its evolutionary consequences in seed plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 48: 135-157.

- Baskin, C.C. y Baskin, R.M. (2007). A revision of Matin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research*. 17:11-20.

- Batygina, T.B. (2019). *Embryology of flowering plants: terminology and concepts* Vo. 3. CRC Press. U.S.A. 598 p.

- Birchler, J. A. (2016). Plant science: Hybrid vigour characterized. *Nature*. 537: 620-621.

- Bräutigam, A., Schlüter, U., Eisenhut, M., y Gowik, U. (2017). On the evolutionary origin of CAM photosynthesis. *Plant physiology*. 174: 473-477.

- Budar, F. y Pelletier, G. (2001). Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*. 324: 543-550.
- Burd, M. (1994). Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*. 60: 83-139.
- Busch, J. W., & Delph, L. F. (2012). The relative importance of reproductive assurance and automatic selection as hypotheses for the evolution of self-fertilization. *Annals of botany*. 109: 553-562.
- Cabahug, R. A., Soh, S. Y. y Nam, S. Y. (2016). Effects of auxin and cytokinin application on leaf cutting propagation in *Echeveria* species. *Flower Research Journal*. 24: 264-273.
- Camacho-Velázquez, A., Arias, S., García-Campusano, F., Sánchez-Martínez, E. y Vázquez-Santana, S. (2018). Seed development and germination of *Strombocactus* species (Cactaceae): A comparative morphological and anatomical study. *Flora*: 242: 89-101.
- Carrillo-Reyes, P., Sosa, V. y Mort, M. E. (2009). Molecular phylogeny of the Acre clade (Crassulaceae): Dealing with the lack of definitions for *Echeveria* and *Sedum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 53: 267-276.
- Charlesworth, D., y Charlesworth, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual review of ecology and systematics*. 18: 237-268
- Chen, Z. J. (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in plant science*. 15: 57-71.
- Cruden, R. W. (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*. 31: 32-46.
- Cruden, R. W. y Lyon, D. L. (2019). Facultative xenogamy: examination of a mixed mating system. In: *The evolutionary ecology of plants* (Ed. H.B. Jane et al.), pp. 171-207. CRC Press.
- Cushman, J. C. (2001). Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*. 127: 1439-1448.

- de la Cruz-López, L.E. (2018). *DNA barcoding en la sistemática y taxonomía integrativa de Echeveria (Crassulaceae)*: Tesis doctoral inédita. Instituto de Ecología, UNAM. México.
- Dell Software. (2012). STATISTICA V 11.0 [Computer software].
- Eason, M. (2018). *Wildflowers of Texas*. Timber Press. U.S.A. 512 p.
- Eggli, U. (2012). *Illustrated Handbook of succulent plants:Crassulaceae*. Springer Science and Business Media. U.S.A. 506 p.
- Evert, F. R. (2006). *Essau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. John Wiley & Sons. U.S.A. 624 p.
- Faegri, K. y Van der Pijil, L. (2013). *Principles of pollination ecology*. Pergamon Press. U.K. 256 p.
- Ferrari, T. E., Lee, S. S., y Wallace, D. H. (1981). Biochemistry and physiology of recognition in pollen-stigma interactions. *Phytopathology*. 71: 752-755.
- Finatto, T., Dos Santos, K. L., Steiner, N., Bizzocchi, L., Holderbaum, D. F., Ducroquet, J. P. y Nodari, R. O. (2011). Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae) 1. *Australian Journal of Botany*. 59: 53-60.
- Frankel, R. y Galun, E. (2012). *Pollintion mechanisms, reproduction and plant breeding*. Springer Science and Business Media. U.S.A. 284 p.
- Franklin-Tong, V. E. y Franklin, F. C. H. (2003). The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 358: 1025-1032.
- Franklin-Tong, V.E. (2008). *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer Science & Business Media. U.S.A. 313 p.
- García-Ruiz, I. y Costea, M. (2014). *Echeveria marianae* (Crassulaceae), a new species from Jalisco, México. *Phytotaxa*. 170: 035-040.

- García-Ruiz, I., Torres, I. y Costea, M. (2016). A new species of *Echeveria* (Crassulaceae) from Michoacán, México. *Systematic botany*. 41: 966-970.
- Gibbs, P. E. (2014). Late-acting self-incompatibility—the pariah breeding system in flowering plants. *New Phytologist*. 203: 717-734.
- Goldberg, E. E. e Igić, B. (2012). Tempo and mode in plant breeding system evolution. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. 66:3701-3709.
- Goodwillie, C., Kalisz, S. & Eckert, C. G. (2005). The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 36: 47-79.
- Guo, J., Liu, H., He, Y., Cui, X., Du, X. y Zhu, J. (2015). Origination of asexual plantlets in three species of Crassulaceae. *Protoplasma*. 252: 591-603.
- Hao, Y. y Zhao, X. (2011). Distinguishing early-acting inbreeding depression from late-acting ovarian self-incompatibility. *Biodiversity Science*. 19: 106-112.
- Hegarty, M. J. y Hiscock, S. J. (2005). Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist*. 165: 411-423.
- Herben, T., Suda, J. y Klimešová, J. (2017). Polyploid species rely on vegetative reproduction more than diploids: a re-examination of the old hypothesis. *Annals of botany*. 120: 341-349.
- Herrera, C. M., Cerdá, X., Garcia, M. B., Guitián, J., Medrano, M., Rey, P. J. y Sánchez Lafuente, A. M. (2002). Floral integration, phenotypic covariance structure and pollinator variation in bumblebee-pollinated *Helleborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology*. 15: 108-121.
- Herrera, I. y Nassar, J. M. (2009). Reproductive and recruitment traits as indicators of the invasive potential of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae) and *Stapelia gigantea* (Apocynaceae) in a Neotropical arid zone. *Journal of Arid Environments*. 73: 978-986.

- Hodson, M.J. y Bryant, J.A. (2012). *Functional biology of plants*. Jhon Wiley & Sons. U.S.A. 400 p.
- Husband, B. C. y Schemske, D. W. (1996). Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*. 50: 54-70.
- INEGI. (2017 A). *Anuario estadístico y geográfico del estado de Coahuila de Zaragoza*. INEGI. México. 550 p.
- INEGI. (2017 B). *Anuario estadístico y geográfico del estado de Puebla*. INEGI. México. 943 p.
- International Crassulaceae Network (*E. strictiflora*). Rescatado de: <http://www.crassulaceae.ch/de/artikel?akID=48&aalD=2&ailD=S&aID=1968>, el 18/03/2019 a las 18:38 hrs.
- International Crassulaceae Network (*E. subalpina*). Rescatado de: <http://www.crassulaceae.ch/de/artikel?akID=48&aalD=2&ailD=S&aID=1113> el 18/03/2019 a las 18:45 hrs.
- Jia, J. y Tan, D. Y. (2012). Variation in style length and anther–stigma distance in *Ixiolirion songaricum* (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany*. 81: 19-24.
- Jimeno Sevilla, H. D. (2008). *El género Echeveria (Crassulaceae) en Veracruz, México*. Tesis Doctoral.
- Jimeno-Sevilla, H. D., Hernández-Ramírez, A. M., Ornelas, J. F. y Marten-Rodríguez, S. (2014). Morphological and nectar traits in *Lindleya* (Crassulaceae) linked to hummingbird pollination in central Veracruz, Mexico. *Haseltonia*. 19: 17-26.
- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. y Srivastava, P.S. *Echeveria rosea*. (1992). *Comparative embryology of Angiosperms: volume 2*. Springer Science and Business Media. U.S.A. 1221 p.
- Júnior, N. S. B. (2017). Evidence for post-zygotic self-incompatibility in *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae). *Plant reproduction*. 30: 69-79.

- Kaufmann, H., Kirch, H., Wemmer, T., Peil, A., Lottspeich, F., Uhrig, H. y Thompson, R. (1992). Sporophytic and gametophytic self-incompatibility. In: *Sexual plant reproduction*. (Ed. M. Cresti *et al.*), pp. 115-125. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kearns, C. A. e Inouye, D. W. (1997). Pollinators, flowering plants, and conservation biology. *Bioscience*, 47(5), 297-307.
- Kubitzki, K. (2012). *Flowering plants: evolution and classification of higher categories*. Springer Science and Business Media. U.S.A. 416 p.
- Lande, R., y Schemske, D. W. (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*. 39: 24-40.
- Lande, R. y Porcher, E. (2017). Inbreeding depression maintained by recessive lethal mutations interacting with stabilizing selection on quantitative characters in a partially self-fertilizing population. *Evolution*. 71:1191-1204.
- Lipow, S. R. y Wyatt, R. (2000). Single gene control of postzygotic self-incompatibility in Poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. *Genetics*, 154(2), 893-907.
- Lloyd, D. G., y Schoen, D. J. (1992). Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International journal of plant sciences*. 153: 358-369.
- Mandujano, M. C. S., Carrillo-Angeles, I., Martínez-Peralta, C. y Golubov, J. (2010). Reproductive biology of Cactaceae. In *Desert plants* (Ed. K.G. Ramawat), pp. 197-230. Springer, Springer, Berlin.
- Márquez-Guzmán, J., Wong, R., Pérez, M., López, L. y Munguía, G. (2016). *Técnicas de laboratorio para el estudio del desarrollo en angiospermas*. Las prensas de Ciencias. México. 248 p.
- Matias-Palafox, M. L., Jiménez-Sierra, C. L., Golubov, J. y Mandujano, M. C. (2017). Ecología reproductiva del “cactus estrella” *Astrophytum ornatum* (Cactaceae): una estrategia de reproducción continua con bajo éxito. *Botanical Sciences*. 95: 245-258.

- Martorell, C. (2007). Detecting and managing an overgrazing-drought synergism in the threatened *Echeveria longissima* (Crassulaceae): the role of retrospective demographic analysis. *Population ecology*. 49: 115-125.
- Martin, A. C. (1946). The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist*. 36: 513-660.
- Naturalista. (2019). *Echeveria strictiflora*. Rescatado de: <https://www.naturalista.mx/taxa/162166-Echeveria-strictiflora>. 18/06/2019 12:42 hrs.
- Naturalista (2019). *Echeveria subalpina*. Rescatado de: <https://www.naturalista.mx/taxa/275986-Echeveria-subalpina> 18/06/2019. 13:57 hrs.
- Neal, P. R. y Anderson, G. J. (2005). Are 'mating systems' 'breeding systems' of inconsistent and confusing terminology in plant reproductive biology? or is it the other way around?. *Plant Systematics and Evolution*. 250: 173-185.
- Opedal, Ø. H. (2018). Herkogamy, a principal functional trait of plant reproductive biology. *International Journal of Plant Sciences*. 179: 677-687.
- Orion Grabbing System. (2000). Orion 6.60 [Computer Software]. Disponible en: <https://orionmicroscopy.com/>
- Parra-Tabla, V., Vargas, C. F. y Eguiarte, L. E. (1993). Reproductive biology, pollen and seed dispersal, and neighborhood size in the hummingbird-pollinated *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae). *American Journal of Botany*. 80:153-159.
- Parra-Tabla, V., Vargas, C. F. y Eguiarte, L. E. (1998). Is *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae) fecundity limited by pollen availability? An experimental study. *Functional Ecology*. 12: 591-595.
- Pérez-Cálix, E. (2008). Crassulaceae. *Flora del Bajío y regiones adyacentes*. 156: 1-141.
- Preston, C. D. y Pearman, D. A. (2015). Plant hybrids in the wild: evidence from biological recording. *Biological Journal of the Linnean Society*. 115: 555-572.

- Qaiser, M., Perveen, A.M. y Sarwar, G. R. (2015). Pollen morphology of the family Crassulaceae from Pakistan and Kashmir and its taxonomic implications. *Pakistan Journal of Botany*. 47: 1481-1493.
- Ramawat, K.G., Mérillon, J.M. y Shivanna, K.R. (2016). *Reproductive biology of plants*. CRC Press. U.S.A. 390 p.
- Raju, M. V. S. y Mann, H. E. (1970). Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*. Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. *Canadian Journal of Botany*. 48: 1887-1891.
- Rayachhetry, M. B., Van, T. K. y Center, T. D. (1998). Regeneration potential of the canopy-held seeds of *Melaleuca quinquenervia* in south Florida. *International Journal of Plant Sciences*. 159: 648-654.
- Reyes-Santiago, J.P., y Brachet, C.I. (2009). *Echeveria mondragoniana*, una nueva especie de la familia Crassulaceae para el estado de Oaxaca, México. *Cactáceas y succulentas mexicanas*. 54: 82-89.
- Reyes-Santiago, J.P., Islas-Luna, M.Á., González-Zorzano, O., Carrillo-Reyes, P., Vergara-Silva, F.R. y Brachet-Ize, C.P. (2011). *Echeveria: manual del perfil diagnóstico del género Echeveria en México*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 142 p.
- Reyes-Santiago, P.J., Islas-Luna, M.Á. y Hernández-Castro, N. (2018). *Guía de apoyo técnico para la descripción morfológica de plantas cultivadas del género Echeveria DC*. SAGARPA. México. 76 p.
- Rieseberg, L. H. (1997). Hybrid origins of plant species. *Annual review of Ecology and Systematics*. 28: 359-389.
- Rodríguez-Rojas, T. J., Andrade-Rodríguez, M., Canul-Ku, J., Castillo-Gutiérrez, A., Martínez-Fernández, E. y Guillén-Sánchez, D. (2015). Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies *Echeveria* en condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 6: 111-123.

- Roulston, T. A. H., Cane, J. H. y Buchmann, S. L. (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny?. *Ecological monographs*. 70: 617-643.
- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T. y Poschlod, P. (2011). Germination traits explain soil seed persistence across species: the case of Mediterranean annual plants in cereal fields. *Annals of botany*. 107: 415-426.
- Sage, T. L., Bertin, R. I., y Williams, E. G. (1994). Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. In: *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants* (Ed. E.G. Williams et al.) pp. 116-140. Springer, Dordrecht.
- Seavey, S. R. y Carter, S. K. (1994). Self-sterility in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae). *American Journal of Botany*. 81: 331-338.
- SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM–059–SEMARNAT–2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres – Categorías de Riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación 2a Sección, 30 de diciembre del 2010. <http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091>
- Simpson, M.G. (2006). *Plant systematics*. Academic Press. U.S.A. 590 p.
- Sreekala, A.K. (2017). Importance of plant reproductive biology in conservation. En *National Conference on “Bioresources: Conservation, Utilization and Future Prospects”* (pp 1-2).
- Takayama, S., e Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 467-489.
- Tang, R., Li, Y., Xu, Y., Schinnerl, J., Sun, W. y Chen, G. (2020). In-situ and ex situ pollination biology of the four threatened plant species and the significance for conservation. *Biodiversity and Conservation*, 29: 381-391.

- Tiffin, P., Olson, S. y Moyle, L. C. (2001). Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 268: 861-867.
- Uhl, C. H. (1992). Polyploidy, dysploidy, and chromosome pairing in *Echeveria* (Crassulaceae) and its hybrids. *American Journal of Botany*. 79: 556-566.
- Uhl, C., Moran, R. y Kimnach, M. (2005). Chromosomes and hybrids of *Echeveria* DC. IX. Series Spicatae (Baker) Berger. *Haseltonia*. 22: 138-150.
- Van Tuyl, J. M. y Lim, K. B. (2003). Interspecific hybridisation and polyploidisation as tools in ornamental plant breeding. En *XXI International Eucarpia Symposium on Classical versus Molecular Breeding of Ornamentals-Part I* 612 (pp. 13-22).
- Vázquez-Cotero, C., Sosa, V. y Carrillo-Reyes, P. (2017). Phylogenetic position of *Echeveria heterosepala* (Crassulaceae): a rare species with diagnostic characters of *Pachyphytum*. *Botanical Sciences*. 95: 515-526.
- Vogler, D. W. y Kalisz, S. (2001). Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution*. 55:202-204.
- Voillemot, M. y Pannell, J. R. (2017). Inbreeding depression is high in a self-incompatible perennial herb population but absent in a self-compatible population showing mixed mating. *Ecology and evolution*. 7:8535-8544.
- Walther, E. (1972). *Echeveria*. California Academy of Sciences. U.S.A. 426 pp.
- Wang, Y., Zhang, D., Renner, S. S. y Chen, Z. (2004). Botany: A new self-pollination mechanism. *Nature*. 431: 39.
- Wendt, T., Ferreira-Canela, M.B., Gelli de Faria, A.P. e Iglesias-Ríos, R. (2001). Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcarnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*. 88: 1760-1767.
- Whitehead, M. R., Lanfear, R., Mitchell, R. J. y Karron, J. D. (2018). Plant mating systems often vary widely among populations. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6: 1-9.

- Xu, Z. y Deng, M. (2017). Crassulaceae. In *Identification and Control of Common Weeds: Volume 2* (Ed. Hangzhou and Springer Science and Bussines Media) pp. 475-486). Springer, Dordrecht.

ANEXOS

Anexo 1. Comparación de la velocidad de germinación t50 (Saatkamp, 2011).

	Velocidad de germinación (t50)
Autogamia (<i>E. strictiflora</i>)	23.5±0.3 días
Autogamia (<i>E. subalpina</i>)	23±0.4 días
Geitonogamia (<i>E. strictiflora</i>)	23.1±0.35 días
Geitonogamia (<i>E. subalpina</i>)	23.7±0.42 días
Xenogamia (<i>E. strictiflora</i>)	23.65±0.21 días
Xenogamia (<i>E. subalpina</i>)	24.15±0.15 días
<i>E. strictiflora</i> x <i>E. subalpina</i>	23.84±0.23 días
<i>E. subalpina</i> x <i>E. strictiflora</i>	24.34±0.19 días