



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA  
EN EL GINECEO DE FLORES MASCULINAS DE  
*Opuntia robusta* J. C. Wendl. (CACTACEAE)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**ROCIO HERNÁNDEZ CRUZ**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

CIUDAD UNIVERSITARIA OCTUBRE 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
**P r e s e n t e**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Estudio de la muerte celular programada en el gineceo de las flores masculinas de Opuntia robusta J.C. Wendl. (Cactaceae)**

realizado por **Hernández Cruz Rocío** con número de cuenta **3-0102553-9** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Margarita Collazo Ortega

Propietario Dra. Silvia Espinosa Matías

Propietario Dra. Sonia Vázquez Santana  
Tutora

Suplente Dra. Martha Juana Martínez Gordillo

Suplente M. en C. Lluvia Hilda Flores Rentería

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 04 de julio de 2008

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Esta Tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Sonia Vázquez Santana en Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Facultad de Ciencias, UNAM, dentro del taller “Biología reproductiva, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”

Este proyecto fue financiado por:

- Proyectos PAPIIT IN216105 y IN226808
- Facultad de Ciencias

A mis **padres** por haberme brindado todo su apoyo  
a lo largo de la carrera y compartir conmigo  
los buenos y malos momentos.

A mi hermana **Ary** porque siempre me  
ayuda, me apoya y me quiere  
sin importar nada.

A mi sobrino **Li**,  
porque traerá unión  
y felicidad a la familia.

A **Toño** porque ha estado conmigo este año siempre  
amándome, apoyándome, y sintiéndose  
“súper” orgulloso de mí.

A **Dany** por su enorme apoyo en las tardes  
en las que no me salían bien las cosas y  
siempre estaba ahí para ayudarme.

A mis **abuelos** que aunque ya no están conmigo,  
sé que me cuidan y que se sentirían  
orgullosos de mí.

A bebé **Rodri** por que me hace  
sonreír de sólo mirarlo.

A mi asesora **Soni** porque me ha apoyado  
y ayudado tanto a lo largo  
de este trabajo.

# AGRADECIMIENTOS

## **Agradezco inmensamente...**

A Dios, a la vida y al destino por ponerme en este científico camino...

A mis padres por guiarme, por TODAS las enseñanzas que me han dado y por que eternamente han estado ahí para sentirse orgullosos de mí y a veces no tanto.

A mi hermana Ary por estar esperando al sobrino más lindo del mundo y por su ayuda para que esto fuera posible.

A Dany porque en estos casi ocho años de amistad me ha enseñado como ser una mejor persona, por estar conmigo en las buenas y en las malas y ayudarme cualquier día y a cualquier hora.

A Toño por ser mi amigo y porque me ha impulsado a echarle ganas en todo lo que hago, a defender lo que pienso y a querer siempre llegar más lejos. Gracias mi amor por todo lo que me has enseñado.

A mi Tía Car por su apoyo, por estar siempre pendiente de mi trabajo y por tener fe en mí.

A mi asesora Soni por brindarme todo su apoyo, conocimiento, ayuda y paciencia a lo largo de esta investigación

A mi amigo Luis porque en estos cinco años siempre ha estado para ofrecerme su hombro, su ayuda, conocimiento y compañía.

A mi amigo Aldebarán por siempre haberme brindado su apoyo personal y académico, por su paciencia y ayuda en este trabajo.

A mi amiga Elizabeth por su ayuda en el laboratorio, por sus pláticas y por siempre dejarme una sonrisa, aunque los cortes no me salieran.

A los maestros del Laboratorio Ana, Clarita, Judith, Kari, Mague, Paty y Ricardo que siempre estuvieron ahí para ayudarme a resolver las dudas, ofrecerme su consejo y compartir su conocimiento.

A mis amigos Amílcar, Arlette, Claudia, José Luis, Miguel, Mónica, Oscar, Romano, Tania y Zenyese por su valiosa amistad, por compartir algunas clases y otros momentos inolvidables, por ayudarme en las cuestiones personales, académicas y en la realización de este trabajo.

A los maestros de la carrera, por enseñarme lo increíble que es la Biología.

A mis compañeros del Taller, Alfonso, Magali y Silvia por sus consejos, compañía y ayuda en las clases, en el campo y en el laboratorio.

A mis compañeras del laboratorio Alma, Amelia, Dulce, Moni y Norma porque siempre estaban ahí para escucharme o resolver mis dudas o dificultades.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A las M. en C. Lluvia Flores, Dra. Margarita Collazo, Dra. Martha Martínez y Dra. Silvia Espinosa por la revisión, valiosos comentarios y correcciones a este trabajo.

Al M. en C. Alejandro Martínez y M. en C. Ana Isabel Bieler del Laboratorio de Microcine por su ayuda en la toma de microfotografías.

Al Biól. Gabriel Orozco de la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular por las imágenes de microscopía confocal.

A la Dra. Silvia Espinosa por el procesamiento y la toma de imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Al Dr. Ricardo Wong por su asesoría durante todo el trabajo de Laboratorio

A la Dra. Judith Márquez por su apoyo, consejos y todo el conocimiento compartido.

A la M en C. Mónica K. Pérez por su apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

*A todas las personas que de un modo u otro hicieron posible  
alcanzar esta meta, espero hacerlos sentir orgullosos y que sepan  
que a lo largo de estas páginas ustedes siempre estuvieron presentes*  
**GRACIAS**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
<b>Sistemas reproductores en Angiospermas</b>	<b>5</b>
<b>La evolución del dioicismo</b>	<b>6</b>
<b>Modelos de evolución</b>	<b>6</b>
<b>Rutas de evolución</b>	<b>7</b>
<b>Sistemas reproductores en la familia Cactaceae</b>	<b>10</b>
<b>En la subfamilia Pereskioideae</b>	<b>10</b>
<b>En la subfamilia Opuntioideae</b>	<b>10</b>
<b>En la subfamilia Cactoideae</b>	<b>13</b>
<b>Características de la Subfamilia Opuntioideae</b>	<b>15</b>
<b>Sistema de estudio: <i>Opuntia robusta</i> J. C. Wendl.</b>	<b>16</b>
<b>Muerte celular programada</b>	<b>17</b>
<b>Estudios embriológicos previos y evidencia de muerte celular programada en <i>Opuntia</i></b>	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>METODO</b>	<b>21</b>
<b>Procedimiento en campo</b>	<b>21</b>
<b>Procedimiento en laboratorio</b>	<b>21</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
<b>Desarrollo del estilo</b>	<b>26</b>
<b>Flores femeninas</b>	<b>26</b>
<b>Flores masculinas</b>	<b>30</b>
<b>Desarrollo del estigma</b>	<b>30</b>
<b>Flores femeninas</b>	<b>30</b>
<b>Flores masculinas</b>	<b>34</b>
<b>Desarrollo del ovario</b>	<b>34</b>
<b>Flores femeninas</b>	<b>34</b>
<b>Flores masculinas</b>	<b>34</b>
<b>Trayectoria y crecimiento de los tubos polínicos en el gineceo en flores masculinas y femeninas</b>	<b>40</b>
<b>Detección de muerte celular programada</b>	<b>43</b>

<b>Controles de la prueba de TUNEL</b>	<b>43</b>
<b>Flores masculinas</b>	<b>43</b>
<b>Flores femeninas</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>LITERATURA CONSULTADA</b>	<b>68</b>

## RESUMEN

La condición sexual en la familia Cactaceae es habitualmente hermafrodita; muy rara vez las flores en antesis son unisexuales. En la mayoría de las flores, se desarrollan inicialmente ambos verticilos sexuales (androceo y gineceo), pero en alguna etapa del desarrollo floral uno de ellos es abortado, estando involucrada la muerte celular programada. Este proceso es común en el desarrollo de las plantas y en algunos casos las células muertas llegan a ser parte de la estructura de la planta, realizando funciones importantes.

El objetivo de este trabajo fue determinar si existe muerte celular programada durante el desarrollo del gineceo en flores masculinas de una población funcionalmente dioica de *Opuntia robusta* J.C. Wendl. En esta especie el gineceo de las flores masculinas y femeninas presenta estilos huecos. En ambas flores el canal estilar está formado por las células de la epidermis interna, las cuales se alargan hacia el interior del canal como las papilas estigmáticas, siendo de mayor longitud las de las flores masculinas. Por el contrario, el tejido de transmisión el cual está formado por diferentes estratos celulares es más reducido en las flores masculinas que en las femeninas. En ambos morfos florales el tejido de transmisión se localiza por debajo de la epidermis interna y a través de él crecen los tubos polínicos a lo largo del estilo, lo cual sugiere que tanto el estigma como el estilo de ambas flores son funcionales. En etapas tempranas las papilas estigmáticas son redondas en ambos tipos florales, pero avanzado el desarrollo el estigma de las flores masculinas se reduce. A diferencia de los ovarios de las flores femeninas que presentan una gran cantidad de óvulos, los de las flores masculinas tienen pocos, los cuales crecen sólo en la base del ovario y no se desarrollan completamente o bien carecen de ellos.

El DNA se encuentra fragmentado en los núcleos del ovario y óvulos, de las flores masculinas indicando la posibilidad de que la muerte celular programada esté implicada en la no funcionalidad de estas estructuras del gineceo. Asimismo se observó este fenómeno en las células del córtex del estilo lo que indica que la diferenciación de los canales de mucílago se lleva a cabo por un proceso de muerte celular programada.

# INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae, endémica de América, cuenta con al menos 2000 especies (Anderson, 2001). La condición sexual en esta familia se reporta generalmente como hermafrodita, sin embargo por atrofia de uno de los verticilos sexuales las flores son funcionalmente unisexuales. Debido a esto en 28 especies de nueve géneros se han reportado diferentes sistemas reproductores al hermafrodita (Orozco, 2002; Sánchez, 2007; Silva, 2007).

Aproximadamente el 10% de las Angiospermas muestran condiciones sexuales diferentes al hermafrodita, ejemplo de éstas son: el sistema monoico, que consiste en plantas con flores masculinas y femeninas; el dioico, que consiste en flores masculinas en una planta y femeninas en otra; el ginodioicismo, en el cual las poblaciones están compuestas de plantas femeninas y hermafroditas; el androdioicismo, cuando las poblaciones tienen plantas con flores masculinas y plantas con flores bisexuales; y el trioicismo, formado por plantas con flores bisexuales, femeninas y masculinas (Ainsworth, 2000).

La subfamilia Opuntioideae de la familia Cactaceae, a la cual pertenece *Opuntia robusta* J.C. Wendl. incluye plantas arborescentes, arbustivas y rastreras. El tronco está bien definido o puede presentar ramas desde la base. Los artículos son globosos, claviformes, cilíndricos o aplanados (cladodios), muy carnosos o leñosos. Las aréolas axilares tienen espinas, pelos y glóquidas (Bravo-Hollis, 1978). La especie *Opuntia robusta* presenta plantas de tipo arbustivo y arborescente, con muchas ramas que alcanzan hasta 1.5 m de longitud, las plantas pueden medir de 1 a 3 metros o más. Los segmentos de tallo son gruesos, redondeados u oblongos, de color verde azulado, de 20-25 cm de longitud (Anderson, 2001).

Las opuntias y los cactus en general están ampliamente distribuidos y bien adaptados a hábitats de ambientes contrastantes, debido probablemente, a la poca competencia con otras plantas, dadas las condiciones tan extremas en las que pueden crecer, por ejemplo incluso en los desiertos mas calurosos de Norteamérica,

el Chihuahuense, Sonorense y el de Mojave, además han desarrollado diversas adaptaciones para soportar la escasez de agua, las altas temperaturas durante el día y muy bajas durante la noche (Rebman y Pinkava, 2001).

La subfamilia Opuntioideae es también un grupo que ha desarrollado sistemas de reproducción diferentes al hermafrodita, los cuales han sido descritos para diversas especies: el subdioico para *Consolea spinosissima* Lem. (Strittmatter *et al.*, 2002), *C. rubescens* (Salm-Dyck ex D.C.) Lem. (Strittmatter y Negrón-Ortíz, 2000), *C. corallicola* Small (Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004), *C. millspaughii* (Britton) A. Berger, *C. moniliformis* (L.) A. Berger, *C. nashii* (Britton) A. Berger, *C. picardeae* (Urb.) Areces (Strittmatter *et al.*, 2006), el dioico para *Opuntia quitensis* F.A.C. Weber (Anderson, 2001), *O. stenopetala* Engelm. (Orozco, 2002), *O. quimilo* K. Schum. (Díaz y Cocucci, 2003), los dioico, trioico y hermafrodita para *O. robusta* J.C. Wendl. (Del Castillo, 1986) y ginodioico para *O. sanfelipensis* Rebman, *O. calmalliana* J.M. Coult, *O. molesta* Brandegees y *O. wolfei* (L.D. Benson) M.A. Baker (Rebman, 1998).

Del Castillo y González (1988) describen que las poblaciones de *O. robusta* pueden ser trioicas y dioicas. Los tres tipos florales reportados en las distintas poblaciones de *O. robusta* son: flores estaminadas, bisexuales y pistiladas. Las anteras son funcionales tanto en las bisexuales como en las estaminadas, mientras que en las pistiladas las anteras están atrofiadas. Los estigmas y los estilos son morfológicamente diferentes entre los morfos y las cámaras del ovario y el número de óvulos se observan reducidos en tamaño y número en las flores estaminadas, con respecto a las femeninas y bisexuales.

En las plantas, la muerte celular es esencial para su desarrollo y supervivencia (Greenberg, 1996). La muerte celular se da por dos procesos: 1) debido principalmente a factores exógenos agudos como trauma, estrés, toxinas, etc, ejemplo de este tipo es la necrosis, definida como muerte celular accidental o resultado de trauma y 2) debido principalmente a factores endógenos, entre estos tipos de procesos se encuentran la apoptosis, la muerte celular programada, también conocida como muerte celular fisiológica o necrobiosis (Nooden, 2004). Recientemente se ha considerado a la muerte celular programada como un evento que provoca la aborción de alguno de los órganos

reproductores en flores funcionalmente unisexuales. Esto puede estar ocurriendo en *O. robusta*, como en otras especies de cactáceas que al inicio del desarrollo son bisexuales y en la antesis presentan flores funcionalmente unisexuales (Flores, 2005; Strittmatter *et al.*, 2006).

En esta investigación se determinará la funcionalidad del gineceo de las flores estaminadas de una población descrita como dioica de *Opuntia robusta*. Se evaluarán los tejidos del gineceo esperando encontrar cambios citológicos característicos de la muerte celular programada, asimismo se comparará el desarrollo morfológico del gineceo entre flores masculinas y femeninas para observar el dimorfismo entre ellas.

# ANTECEDENTES

## SISTEMAS REPRODUCTORES EN ANGIOSPERMAS

Cerca del 90% de las angiospermas producen flores bisexuales, es decir, que presentan estambres y pistilo, el 10% restante, evolucionó a la unisexualidad, separando los sexos espacialmente en diferentes flores. Esto se puede manifestar en el monoicismo, en el cual los verticilos sexuales (androceo y gineceo) se encuentran en flores diferentes en una misma planta, y el dioicismo, en el cual las flores femeninas y masculinas se encuentran en diferentes plantas (Ainsworth, 2000).

Existen otros sistemas reproductores intermedios que se originaron durante la evolución del sistema hermafrodita al dioico y monoico en los que surgen flores unisexuales. Estos son: 1) el ginodioicismo, en el cual, las poblaciones están compuestas de plantas con flores femeninas y plantas con flores hermafroditas; 2) el androdioicismo, en el que las poblaciones tienen plantas con flores masculinas y plantas con flores hermafroditas; 3) el trioicismo, con poblaciones de plantas con flores hermafroditas, plantas con flores femeninas y plantas con flores masculinas; 4) el ginomonoicismo, en cuyas plantas hay flores femeninas y hermafroditas; 5) el andromonoicismo, poblaciones con plantas que tienen flores masculinas y hermafroditas; 6) el trimonoicismo, en el que las plantas tienen flores hermafroditas, femeninas y masculinas (Ainsworth, 2000).

Lebel-Hardenack y Grant (1997) aseguran que las flores de la mayoría de las especies monoicas y dioicas no pueden distinguirse de las flores hermafroditas durante las primeras etapas de desarrollo porque ambos primordios de estambres y carpelos están presentes en las flores que finalmente serán unisexuales. La aborción de los primordios carpelares en la flor masculina y de los primordios estaminales en la flor femenina ocurre después, variando, en dependencia de la especie la etapa en la cual se suprime el desarrollo.

## LA EVOLUCIÓN DEL DIOICISMO

Entre los mecanismos que promueven la reproducción cruzada se encuentran: la separación temporal de la maduración del androceo y del gineceo en flores bisexuales (protandria y protoginia, respectivamente), los mecanismos de autoincompatibilidad y el dioicismo (Ainsworth, 2000).

El dioicismo se ha observado entre las familias de angiospermas basales y derivadas. La distribución filogenética de este sistema reproductivo indica que el dioicismo surgió independientemente muchas veces en linajes hermafroditas (Bawa, 1980; Anderson *et al.*, 2000).

### **Modelos de evolución**

Los modelos de evolución de las poblaciones dioicas, sugieren que:

- El dioicismo es un mecanismo por el cual se evitan los efectos deletéreos de la endogamia por medio del entrecruzamiento obligado, manteniendo, la mayoría de las veces, mayor variación genética.
- En las plantas hermafroditas, la producción de polen y de óvulos puede limitarse mutuamente, por lo que la separación espacial de los sexos puede ocasionar una eficiente distribución de los recursos (Ainsworth, 2000).

Para Bawa (1984) la diferencia en la asignación de recursos para varias funciones en los distintos morfos sexuales es un aspecto interesante, especialmente las diferencias entre los mutantes estériles masculinos, femeninos y los bisexuales, los cuales pueden ser eventualmente reemplazados. Los mutantes asignarán más recursos a las funciones masculinas o femeninas que los hermafroditas.

## Rutas de evolución

Existen tres rutas posibles para originar el dioicismo:

- Vía hermafroditas: para esta ruta, existen dos vías de evolución, la primera con dos tipos de mutaciones, ocasionando esterilidad masculina o femenina en dos tipos florales, en la que se pueden encontrar sistemas intermedios, como los androdioicos y los ginodioicos (Ainsworth, 2000). La segunda ruta propone que los genes de esterilidad masculina se expanden en una población hermafrodita, resultando en una etapa intermedia que involucra individuos femeninos y hermafroditas, finalmente modificadores genéticos de la fertilidad femenina gradualmente convierten a los hermafroditas en masculinos, resultando en dioicismo (Barret, 2002).
- Vía monoicismo: la selección disruptiva en las poblaciones monoicas altera la proporción de flores femeninas y masculinas en cada individuo, ocasionando el aumento gradual en la especialización de la función sexual en cada género, hasta originar plantas unisexuales (Ainsworth, 2000; Barret, 2002).
- Vía distilia: cuando existen diferentes posiciones de anteras y estilos (flores *pin* y *thrum*), la transición surge al aumentar la especialización de cada tipo floral, los morfos longistilos y brevistilos en muchos casos se convierten en flores femeninas y masculinas respectivamente, así el dioicismo surge de la especialización de cada tipo floral donde cada uno termina con una sola función sexual (Ainsworth, 2000).

Se han encontrado correlaciones entre el dioicismo y algunos factores ecológicos y morfológicos (Baker, 1984). Se ha documentado que existe una correlación entre algunos factores ecológicos y el dioicismo, entre éstos se encuentran el tipo de polinización, la dispersión de semillas, y la forma de vida, por ejemplo la mayoría de las especies dioicas de un bosque seco en Costa Rica son polinizadas por abejas de tamaño pequeño. Respecto a los modos de dispersión de las semillas, se observó que en tres localidades con diferentes tipos de vegetación en Costa Rica, la mayoría de las especies dioicas

tienen frutos carnosos por lo que sus semillas son dispersadas por animales (Bawa, 1980).

En un análisis categórico multivariado hecho por Renner y Ricklefs (1995) se corrobora la idea de correlación entre el dioicismo y factores ecológicos, encontrando que la mayoría de las especies dioicas de angiospermas tienen tipos de polinización anemófila e hidrófila y dispersión biótica de semillas, existiendo una correlación entre el dioicismo y la forma de vida. Estos autores establecieron que la mayoría de las familias con especies dioicas son de hábito arbóreo o arbustivo, principalmente de tipo enredadera y que el dioicismo es poco común en familias con especies herbáceas.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Barret (1998) quien señala que el dioicismo está asociado a la polinización anemófila o hidrófila y a las plantas de tipo enredaderas (“climbing growth form”). Pero algunos estudios ejemplifican algunas excepciones, por ejemplo, Díaz y Cocucci (2003) reportan que la polinización para la especie ginodioica *Opuntia quimilo* K. Schum. es llevada a cabo por aves y abejas de tamaño grande (15-18mm). Valiente-Banuet *et al.* (1997) reportaron para la especie androdioica *Neobuxbaumia mezcalaensis* Bravo polinización por murciélagos. Para *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton and Rose se reporta polinización principalmente por murciélagos, aunque también por aves, abejas y polillas, encontrando que los sistemas de reproducción trioico y ginodioico, varían en un área geográfica, probablemente en relación con la abundancia de murciélagos polinizadores del género *Leptonycteris* (Fleming *et al.*, 1994, 1998).

Sin embargo, también se ha reportado que la frecuencia de los sistemas sexuales en una comunidad vegetal no siempre está asociada con la forma de vida, tipo de vegetación, sistema de polinización, ni fenología, lo cual fue demostrado por Lemus-Jiménez y Ramírez (2005) en tres hábitats de la planicie costera de Paraguaná, Venezuela. Estos autores mencionan que la baja proporción de especies dioicas podría estar asociada principalmente a las limitaciones edáficas y climáticas caracterizadas por altas temperaturas, fuerte velocidad del viento, constante arrastre de finas partículas de

arena, fuerte radiación y suelos mayormente arenosos calcáreos, así como a la historia geológica de dicha península.

Se han desarrollado diferentes modelos evolutivos para explicar las relaciones entre el dioicismo y los polinizadores. En el modelo de evolución desarrollado por Vamosi y Otto (2002) en plantas polinizadas por animales proponen que las flores masculinas tienden a desarrollar flores más vistosas que las flores femeninas, especialmente cuando los polinizadores son abundantes; demuestran que este dimorfismo, al incrementarse, podría aumentar el riesgo de extinción en las plantas dioicas si los polinizadores escasean, porque éstos pueden dejar de visitar a las flores femeninas. Según los autores, esto podría explicar por qué algunas plantas dioicas tienen flores inconspicuas y son polinizadas por el viento o tienen múltiples polinizadores y también por qué la proporción de plantas dioicas es mucho menor en relación con las hermafroditas.

En un estudio con *Fragaria virginiana* Duchesne, Ashman (2000) encuentra que el dimorfismo entre las flores masculinas y femeninas afecta el número de polinizadores que las visitan, incluidos entre ellos hormigas, abejas y moscas. Observó cierta discriminación hacia las flores femeninas, proponiendo que la selectividad del polinizador puede afectar la evolución del dimorfismo floral, llevando al mantenimiento de los estambres y pétalos en las flores femeninas.

Específicamente en Cactaceae, Scobell y Schultz (2005) mencionan que las poblaciones hermafroditas de *Echinocereus coccineus* Engelm. son polinizadas por colibríes, mientras que las poblaciones dioicas que se encuentran en áreas donde no abundan los colibríes son polinizadas por abejas. Aseguran que esto probablemente se deba a que los colibríes propician una tasa mayor de entrecruzamiento que las abejas, de esta forma, las poblaciones hermafroditas se mantienen donde abundan los colibríes, y las poblaciones dioicas en sitios con menor proporción de colibríes pero con mayor proporción de abejas.

Del Castillo y González (1988) encuentran que los principales polinizadores de *O. robusta* son abejas de tamaño mediano (hasta 14 mm) y que muestran el mismo

comportamiento en las flores de las tres formas sexuales, es decir que los cambios en la morfología floral no parecen ser suficientes para limitar el acceso de un tipo de polinizador y favorecer a otro.

## SISTEMAS REPRODUCTORES

### **En la familia Cactaceae**

Según Parfitt (1985) las condiciones sexuales de las cactáceas han sido mal interpretadas por dos razones: primero, por datos inadecuados de las poblaciones (sexado); segundo, por el uso indiscriminado de la palabra dioico, lo cual normalmente no deja claro el verdadero sistema reproductor, aun cuando las poblaciones o especies sean estudiadas correctamente.

La mayoría de las especies dioicas descritas para la familia empiezan su desarrollo como flores bisexuales pero a lo largo de éste el crecimiento de uno de los verticilos sexuales se detiene, resultando en la funcionalidad de sólo uno de ellos.

### **En la subfamilia Pereskioideae**

Leuenberger (1986) describe a *Pereskia portulacifolia* (L.) D.C. y Areces (1984, en Leuenberger, 1986) a *P. zinniiflora* D.C. como dioicas. Reportan en estas dos especies la existencia de flores funcionalmente estaminadas, con estilo corto, lóbulos estigmáticos filiformes sin papilas y el lóculo del ovario muy pequeño, en el que los óvulos no se desarrollan o son anormales. En las flores pistiladas de *P. zinniiflorase* observan lóbulos estigmáticos bien desarrollados, papilados, de casi 5 mm de largo, en el ovario la placentación es parietal y se desarrollan numerosos óvulos, sin embargo los estambres son estériles.

Areces-Mallea (1992) reporta a *P. marcanoi* Areces como especie dioica, observó que las flores estaminadas tienen numerosos estambres fértiles, estilo vestigial con algunos "lóbulos estigmáticos" filiformes y erectos, sin papilas, mientras que en las flores pistiladas observó numerosos óvulos en el ovario y el estigma con múltiples lóbulos papilados, pero con los estambres reducidos y estériles.

## En la subfamilia Opuntioideae

Del Castillo (1986), reporta poblaciones de *Opuntia robusta* con plantas dioicas, trioicas y hermafroditas, en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes e Hidalgo y que existe una diferenciación ecológica entre individuos unisexuales y bisexuales. El hermafroditismo predomina en sitios donde son menores las oportunidades de que un individuo deje descendencia a través de fecundación cruzada, es decir en sitios marginales en donde la distancia entre los individuos es grande y por la presencia de vecinos cercanos de otras especies que compiten por los polinizadores; mientras que el dioicismo predomina en el centro de las poblaciones debido a que los individuos unisexuales son incapaces de dejar descendencia en ausencia de polinizadores.

Rebman (1998) describe a *Opuntia sanfelipensis* Rebman como especie ginodioica debido a que, en la población estudiada aproximadamente la mitad de las flores colectadas tenían anteras sin polen y también encontró individuos con flores hermafroditas; propone que debido a la cercanía evolutiva las especies *O. wolfei* (L. D. Benson) M.A. Baker, *O. calmalliana* J.M. Coult. y *O. molesta* Brandegees también podrían ser ginodioicas.

Strittmatter y Negrón-Ortiz (2000) describen a *Consolea rubescens* (Salm-Dyck ex D.C.) Lem como especie dioica, en la cual las flores pistiladas, tienen un androceo que no es funcional, es decir las anteras no producen polen. Mientras que en las flores estaminadas el androceo está bien desarrollado y es funcional. Las flores estaminadas tienen el gineceo bien desarrollado, pero no es funcional, no se produce fruto y los lóbulos estigmáticos permanecen cerrados, lo contrario ocurre en las flores pistiladas donde el gineceo está bien desarrollado y es funcional.

Anderson (2001) describe a *O. quitensis* F.A.C. Weber como especie con flores funcionalmente unisexuales.

Orozco (2002) documenta que *O. stenopetala* Engelm. tiene un sistema sexual funcionalmente dioico, dado que los granos de polen no se desarrollan en las flores pistiladas ni hay formación de óvulos maduros ni estigmas en las flores estaminadas,

aunque la presencia de órganos vestigiales dé la apariencia de flores bisexuales. Flores (2005) describe que las anteras de las flores pistiladas de esta especie se desarrollan de manera similar a las estaminadas hasta la etapa de célula madre de la microspora (CMMi), y que al entrar en meiosis, la CMMi presenta características estructurales típicas de muerte celular programada. Observó compactación de la cromatina, aumento en el número y tamaño de vacuolas y colapso celular, lo cual ocasionó la separación de la pared y también ocurre fragmentación del DNA nuclear, la cual fue evidenciada mediante la prueba de TUNEL (Roche, 2002). La autora sugiere que las CMMi entran al programa de muerte celular programada propiciando la esterilidad masculina en este morfo floral. De igual forma el tapete se hipertrofia y en las capas de la pared de las anteras hay alteraciones, sugiriendo también muerte celular programada.

Strittmatter *et al.* (2002), describen a *Consolea spinosissima* Lem como especie subdioica, con tres morfos florales: masculino, femenino y hermafrodita. Observaron que en las flores hermafroditas el androceo es funcional y produce granos de polen viables y el gineceo es parcialmente funcional, ya que en algunos individuos en etapa de antesis los óvulos degeneran, o sólo los óvulos de la parte superior del ovario terminan su desarrollo. Las flores masculinas tienen estambres más largos, los ovarios se encuentran bien desarrollados, con numerosos óvulos, estilo y estigma, sin embargo en antesis, los lóbulos estigmáticos permanecen cerrados, hay baja disponibilidad de reservas en el tejido de transmisión, por lo que no se permite el crecimiento de tubos polínicos y los óvulos son abortados. Las flores femeninas tienen estambres con filamentos cortos y marchitos, anteras no dehiscentes y sin polen, en éstas los lóbulos estigmáticos se encuentran bien desarrollados y los ovarios llenos de óvulos.

Díaz y Cocucci (2003) reportan a *Opuntia quimilo* K. Schum. como especie ginodioica, en la que las anteras de las flores pistiladas son estériles y más pequeñas en relación con las de las flores hermafroditas y son estériles. En éstas las anteras son funcionales y producen polen. Las flores pistiladas producen mayor cantidad de óvulos que las hermafroditas, los estilos y estigmas de ambas flores son funcionales.

Negrón-Ortiz y Strittmatter (2004) describen una única población silvestre de *Consolea corallicola* Small cuya morfología floral indica que la especie es hermafrodita. Las flores producen granos de polen viables, pero raramente semillas viables y cuando éstas se desarrollan, son por agamosperma. Aunque las flores empiezan su desarrollo como hermafroditas, en la antesis los óvulos son abortados. Durante la ontogenia el megagametofito se caracteriza por la excesiva presencia de gránulos de almidón, lo que puede estar relacionado con la reducción de la nucela y por lo tanto la aborción de los óvulos como sucede en *C. spinosissima* (Strittmatter *et al.* 2002). Las anteras tienen un proceso de desarrollo normal, produciendo granos de polen viables. Sus estudios sugieren que estas flores, superficialmente hermafroditas, son funcionalmente estaminadas y los individuos sobrevivientes en la población son todos masculinos. Su hipótesis es que *C. corallicola* tiene un sistema reproductivo dioico, tal como se presenta en otras especies del género *Consolea* y el morfo femenino se encuentra aparentemente extinto.

Strittmatter *et al.* (2006) realizaron un estudio comparativo del desarrollo del microsporangio en seis especies subdioicas del género *Consolea*, encontrando que en *C. millspaughii* (Britton) A. Berger, *C. moniliformis* (L.) A. Berger, *C. nashii* (Britton) A. Berger y *C. picardeae* (Urb.) Areces los tipos florales inician su desarrollo como flores bisexuales pero en la madurez se desarrollan dos tipos florales, las flores pistiladas cuyas anteras carecen de polen y las flores estaminadas que tienen óvulos que abortan en la antesis.

## **En la subfamilia Cactoideae**

Lindsay y Dawson (1952) describen una población de *Mammillaria neopalmeri* R.T. Craig, con flores unisexuales y hermafroditas.

Kimnach (1982) reporta poblaciones ginodioicas y hermafroditas de la especie *Selenicereus innesii* Kimnach, en las que las flores pistiladas carecen totalmente de estambres, encontró que la cámara ovulífera contiene pocos óvulos y está parcialmente llena de estilos rudimentarios que terminan en papilas estigmáticas. Las flores hermafroditas tienen el androceo y el gineceo normalmente desarrollados y funcionales, de acuerdo a esto, Parfitt (1985) sugiere que la especie en la población estudiada por

Kimnach podría ser funcionalmente hermafrodita debido a que las flores pistiladas presentan malformaciones y pueden ser totalmente estériles.

Hoffman (1992), reporta para poblaciones dioicas de *Echinocereus coccineus* Engelm. que las flores masculinas son de mayor tamaño que las femeninas; que hay diferencias en las dimensiones del androceo. Encontró en las flores masculinas estambres más largos y anteras más grandes; pero el número de óvulos y área de los lóbulos estigmáticos en éstas es mucho menor que en las femeninas y no desarrollan frutos; mientras que en las flores femeninas las anteras no desarrollan granos de polen.

Fleming *et al.*, (1994) describen la biología reproductiva de la especie trioica *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton and Rose, reportan a las flores pistiladas con anteras que carecen de granos de polen, éstas son pequeñas y oscuras, el gineceo está bien desarrollado y es funcional. En las flores estaminadas el androceo está bien desarrollado y es funcional, produciendo una gran cantidad de granos de polen, tienen estilos y estigmas totalmente desarrollados, pero el ovario usualmente carece de óvulos. En las flores hermafroditas tanto el androceo como el gineceo se encuentran bien desarrollados y son funcionales. Por último las flores neutras que tienen el androceo similar al de las flores pistiladas, por lo que no producen granos de polen y el gineceo es similar al de las flores estaminadas, por lo que no desarrollan óvulos ni semillas.

Valiente-Banuet *et al.*, (1997) reportan para la especie *Neobuxbaumia mezcalaensis* Bravo poblaciones con sistema reproductivo androdioico, en las plantas masculinas y hermafroditas el androceo se encuentra bien desarrollado y es funcional; en las plantas masculinas el gineceo se encuentra reducido y sin óvulos maduros.

Baker (2006) describe a *Echinocereus yavapaiensis* M.A. Baker, con plantas con flores masculinas con granos de polen fértil y sin frutos, mientras que las plantas con flores femeninas producen granos de polen estériles.

Sánchez (2007) realizó el estudio embriológico en una población de *Mamillaria dioica* K. Brandegeer encontrando que la población estudiada es ginodioica. La flor hermafrodita presenta desarrollo normal del androceo y gineceo. La flor femenina tiene

desarrollo normal del gineceo y las anteras se atrofian antes de la meiosis, por lo que no se desarrollan granos de polen.

### CARACTERÍSTICAS DE LA SUBFAMILIA OPUNTIOIDEAE

Está formada por plantas arborescentes, arbustivas y rastreras. El tronco está bien definido o puede presentar ramas desde la base. Las ramas son erectas, extendidas o postradas. Los artículos o cladodios son globosos, claviformes, cilíndricos o aplanados, muy carnosos o leñosos. Las aréolas axilares presentan espinas, pelos y glóquidas, generalmente las aréolas de la parte superior del artículo son las productoras de las flores (Bravo-Hollis, 1978).

Rebman y Pinkava (2001) señalan que la subfamilia Opuntioideae ha evolucionado rápida y exitosamente por las ventajas que le confiere la combinación de las siguientes estrategias reproductivas:

1. Reproducción sexual, permitiendo mantener la variabilidad genética y el desarrollo del dioicismo y ginodioicismo, lo cual incrementa el entrecruzamiento y la diversidad genética de las poblaciones.
2. Reproducción vegetativa a través de segmentos del tallo, frutos y brotes de raíces y semillas no sexuales.
3. Poliploidía, permitiendo que el DNA adicional a través de mutaciones proporcione novedades genéticas.
4. Hibridización interespecífica, lo cual permite el intercambio de genes entre poblaciones genética o parcialmente separadas, vía fertilidad de híbridos.

Reyes-Argüero *et al.* (2006) establecen que el género *Opuntia* es probablemente el más exitoso entre los géneros de cactáceas de acuerdo a su distribución, características de dispersión y procesos de propagación vegetativa. Su éxito ecológico y evolutivo podría ser atribuido a la fuerte asociación que existe con los polinizadores y dispersores de semillas.

En el género *Opuntia*, subgénero *Platyopuntia* muchas de las especies de porte arborescente que predominan en el Altiplano Mexicano, y que dan la fisonomía típica de las nopaleras de estas regiones son marcadamente calcífugas, es decir, que muestran selectividad en sus patrones de distribución por sustratos de origen no calizo de tipo silíceo, como riolita y basalto, aunque sus áreas de distribución estén contiguas a sitios de sustrato calizo donde no se desarrollan. Entre ellas se pueden mencionar específicamente a *Opuntia robusta*, *O. streptacantha* Lem., *O. leucotricha* D.C., *O. chavena* Griffiths, *O. hyptiacantha* F.A.C. Weber y *O. pachona* Griffiths (Del Castillo, 1986,1995).

### **Sistema de estudio: *Opuntia robusta* J. C. Wendl.**

*Opuntia robusta* tiene plantas arbustivas a casi arbóreas con muchas ramas, que alcanzan hasta 1.5 m de longitud, de 1-3 m o más de altura. Los segmentos del tallo son redondos u oblongos, de color verde-azulado, gruesos, de 20-25 cm de longitud y de 10-12.5 cm de ancho. Hojas muy finas, rojizas, de 4 mm de longitud. Las aréolas son algo elevadas, de tamaño variable, separadas una de otra por 4-5.5 cm. Las glóquidas son numerosas de color amarillentas a cafés. Tienen de 2-12 espinas, aunque de vez en cuando están ausentes, son duras, con bases oscuras, de 5 cm de longitud. Las flores son amarillas, de 5-7 cm de longitud y de 5 cm de diámetro. Los frutos son globosos, de color rojo, de 7-9 cm de longitud (Fig. 1). Su distribución se reporta en el Centro de México, en los estados de Zacatecas, Querétaro, San Luís Potosí, Guanajuato, Hidalgo y Michoacán (Bravo-Hollis, 1978).



Fig 1. *Opuntia robusta* en floración.  
(Tomada de Anderson, 2001)

Del Castillo y González (1988) describen los tres tipos florales encontrados en distintas poblaciones de esta especie. Las flores estaminadas, al igual que las hermafroditas, tienen anteras que producen grandes cantidades de polen (las estaminadas en mayor cantidad). Las anteras de las flores pistiladas están atrofiadas y no tienen polen fértil. En las flores estaminadas los estilos son más largos, pero delgados y en las pistiladas son más cortos y las hermafroditas tienen un estilo de tamaño intermedio, lo que los lleva a proponer que son heterostílicas. En las flores estaminadas el estigma tiene dos o tres lóbulos atrofiados y erectos y en las pistiladas y hermafroditas los lóbulos están en forma de copa. La cavidad del ovario está reducida en las flores estaminadas con óvulos atrofiados en la parte basal. En las flores pistiladas y hermafroditas el lóculo es más grande y sus paredes están cubiertas por numerosos óvulos.

## MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Existen numerosos casos en los que la muerte celular en las plantas es parte de su desarrollo normal, y éstas muestran algunos de los cambios estructurales característicos de la apoptosis en los animales. Estos cambios citológicos y bioquímicos incluyen condensación nuclear, agregación de cromatina en los márgenes nucleares, formación de cuerpos apoptóticos, migración de fosfatidil serina a la superficie externa de la membrana plasmática, contracción celular y fragmentación del DNA (Nooden, 2004).

Se han descrito cuatro tipos de muerte celular programada en plantas, asociados principalmente a la ruptura de vacuolas y la subsecuente aparición de las marcas típicas de muerte celular programada. Sin embargo, en algunos casos el colapso de las vacuolas es precedido por la alteración de otros organelos celulares, como la mitocondria (Vianello *et al.*, 2007).

En las células animales y en las plantas las mitocondrias juegan un papel importante en la inducción de muerte celular programada debido a la liberación de diversos componentes desde el espacio intermembranal al citosol. Entre ellos las nucleasas y el citocromo *c*, éste es un componente clave de la cadena de transporte de electrones, esta molécula inicia la ruta de activación de caspasas, que son las proteasas que llevan a cabo la apoptosis (Liu *et al.*, 1996; Jiang y Wang, 2004; Vianello *et al.*, 2007).

La fragmentación del DNA es considerada como un indicador del proceso de apoptosis, ésta es detectada mediante la técnica inmunológica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), la cual consiste en marcar el extremo 3'OH libre con nucleótidos modificados en los que una sonda fluorescente los evidencia. La enzima responsable de pegar estos nucleótidos a los extremos 3'OH libres del DNA es la TDT (Terminal deoxinucleotidil-transferasa), de esta manera la fragmentación del DNA en multímeros de oligonucleosomas durante la muerte celular se hace evidente (Roche, 2002).

En algunas especies con flores unisexuales, inicialmente ambos órganos sexuales están presentes, y posteriormente a lo largo del desarrollo uno de los verticilos es abortado (Greenberg, 1996).

El maíz (*Zea mays* L.) por ejemplo, es una especie monoica que tiene inflorescencias masculinas y femeninas en la misma planta. La determinación de la unisexualidad en las flores del maíz involucra cambios citológicos importantes en el destino de los órganos sexuales, así como también marcadas diferencias en la morfología de los tejidos florales. El proceso de determinación sexual en el maíz muestra que ambas inflorescencias en etapas tempranas del desarrollo son básicamente bisexuales, con

potencial de desarrollar siempre ambos sexos, pero su destino sexual y eliminación selectiva está determinado en cada etapa de desarrollo y controlado por factores genéticos, muerte celular programada y hormonas, para finalmente dar origen a flores masculinas en la espiga y flores femeninas en el jilote (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1994; Calderón-Urrea y Dellaporta, 1999).

## **Estudios embriológicos previos y evidencia de muerte celular programada en *Opuntia***

Silva (2007) estudió el desarrollo embriológico de las flores masculinas y femeninas de *O. robusta*, describiendo las etapas del desarrollo y las diferencias morfológicas e histológicas entre flores masculinas y femeninas. Actualmente, se está llevando a cabo la determinación de la muerte celular programada en el androceo de las flores femeninas de *O. robusta* y *O. stenopetala*. (Silva *et al.*, 2007). Para determinar si durante el desarrollo de las anteras en flores pistiladas existe muerte celular programada, y si está relacionada con la liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol como se ha reportado para otras especies (Balk *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999). Asimismo en *O. stenopetala* se está describiendo morfológica e histológicamente el gineceo de flores masculinas, sin embargo aun no se ha determinado si la muerte celular programada interviene durante la aborción de este verticilo como sucede en el androceo de las flores femeninas (Vázquez-Santana *et al.*, 2007).

Debido a que los sistemas de reproducción que incluyen flores unisexuales son poco comunes dentro de la familia Cactaceae, los estudios embriológicos que describen el desarrollo y la morfología de las estructuras florales y los que determinen la funcionalidad de los verticilos sexuales requieren ser realizados para establecer el sistema reproductor.

# HIPÓTESIS

La esterilidad del gineceo de las flores funcionalmente masculinas de *Opuntia robusta* se atribuye a un proceso de muerte celular programada.

## OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si existe muerte celular programada durante la ontogenia del gineceo en flores funcionalmente masculinas de *O. robusta*.

Objetivos particulares:

- Describir el desarrollo morfológico del estilo y el estigma en flores funcionalmente masculinas y femeninas.
- Determinar si los tejidos del estilo de las flores funcionalmente masculinas permiten el crecimiento de tubos polínicos.
- Determinar la trayectoria de los tubos polínicos a través del estilo en ambos morfos florales.
- Conocer la etapa del desarrollo floral y los tejidos o células involucradas en los cuales se produce la aborción del gineceo en las flores funcionalmente masculinas.
- Determinar si hay muerte celular programada en óvulos, placenta, estilo y estigma de las flores funcionalmente masculinas y femeninas.

# MÉTODO

## Procedimiento en campo

El material biológico (flores, botones florales de individuos masculinos y femeninos, y cladodios con flores en antesis) de *Opuntia robusta* se colectó en la localidad ubicada en el kilómetro 17 de la carretera San Juan del Río-Tequisquiapan, en el estado de Querétaro (20° 30.795' N, 99° 54.249' W).

## Procedimiento en laboratorio

De acuerdo con Jiménez (2002), Flores (2005) y López *et al.* (2005) se estableció la siguiente metodología: de acuerdo al tamaño de los botones florales y flores masculinas y femeninas se establecieron 14 etapas de desarrollo (Tabla 1).

Los cladodios se mantuvieron en un recipiente bajo riego y régimen de luz y se realizaron polinizaciones manuales en las flores.

Posteriormente los botones y las flores se disectaron retirando las unidades del perianto y parte del pericarpelo, se fijaron en formaldehído al 4% en buffer de PBS 1X y en FAA (formol, ácido acético, alcohol etílico).

Las muestras fijadas con formaldehído al 4% se enjuagaron con buffer de PBS 1X, haciendo 3 cambios de 15 min cada uno. Las estructuras disectadas se deshidrataron gradualmente en etanoles 50%, 70%, 85%, 96% y dos cambios de alcohol absoluto, 30 min en cada uno.

A partir de etanol absoluto algunas de las muestras se infiltraron en resina LR-White:etanol absoluto en una proporción 1:1 por 24 h y a 4°C y posteriormente dos cambios en LR-White puro por 12 h a 4°C. Las muestras se incluyeron en LR-White puro en cápsulas Been y se polimerizaron a 56°C en ausencia de oxígeno. Los bloques obtenidos se cortaron a 1-2 µm de grosor en el ultramicrotomo JMC MT990 y se tiñeron con azul de toluidina.

Otra parte del material que consistió de estilo, estigma y ovario de flores en diferentes etapas de desarrollo y en antesis, polinizadas en el laboratorio, fue pasado por Xilol por 15 min y después en mezclas de Xilol:Paraplast en proporción 1:1 durante 12 h a

60°C. A continuación se infiltró en Paraplast puro durante 24 h a 60° C. Finalmente se incluyó en Paraplast puro y se realizaron cortes de 10 µm de grosor en el micrótopo rotatorio American Optical 820, algunos de los cortes se tiñeron con azul de anilina y se observaron en el microscopio de fluorescencia Olympus Provis AX750 y otros se tiñeron con safranina/verde rápido y se observaron y fotografiaron en un fotomicroscopio fotónico Olympus Provis AX750, y en un fotomicroscopio de imagen estructurada Zeiss Imager Z1. Otros cortes de estilo y estigma fueron utilizados para pruebas histoquímicas de taninos (vainillina) y se observaron al microscopio fotónico.

Los estilos polinizados o de flores en etapa 14 post-fecundación se mantuvieron en hidróxido de potasio (KOH) por 12 horas aproximadamente, y luego se pasaron a azul de anilina al 1% en  $K_3PO_4$  0.1N y se dejaron toda la noche en oscuridad a 4°C, con este material mediante un proceso denominado “squash” que consistió en aplastar los estilos con un cubreobjetos sobre el portaobjetos, se realizó la técnica de fluorescencia para ver tubos polínicos en un microscopio de fluorescencia.

Para las observaciones en el MEB el material fijado en FAA se deshidrató en alcoholes graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) durante 2 hr en cada uno. Las muestras se llevaron a punto crítico en la desecadora CPD 030 de Baltec y se montaron en portamuestras de aluminio cubriéndolos con una capa fina de oro en una ionizadora Dentum Vacuum Desk II. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV y se tomaron placas fotográficas de 4x5 pulgadas Kodak T-MAX 100.

Para la prueba de TUNEL se obtuvieron cortes en resina LR-White de 1 a 2 µm de grosor y cortes en paraplast de 2 a 5 µm de grosor, los cuales se pusieron en portaobjetos especiales Superfrost (Fisher) para inmunolocalización, luego se hidrataron en buffer de PBS 1X por 15 min. Se agregó la proteinasa K (dos gotas) y se incubaron a 30-35°C por 15 min. Posterior a esto se separó la laminilla que fue utilizada como control positivo, a la cual se le agregó la DNAasa. El resto de las preparaciones se lavaron 3 veces con buffer de PBS 1X, cada uno por 3 min y se esperó hasta terminar el tratamiento de la preparación del control positivo (ver el siguiente párrafo). También se separó la preparación que fue utilizada como control negativo (sin enzima TdT).

Tabla 1. Etapas de desarrollo y medidas de los botones florales.

ETAPA	LONGITUD (cm)
1	1.20 – 1.59
2	1.60 – 2.0
3	2.10 – 2.59
4	2.60 – 3.0
5	3.10 – 3.39
6	3.40 – 3.79
7	3.80 – 4.0
8	4.10 – 4.39
9	4.40 – 4.7
10	4.70 – 5.0
11	5.10 – 5.39
12	5.40 – 5.79
13 (antesis)	5.80 – 6.0
14 (post- fecundación)	Los tépalos se vuelven a cerrar después de la antesis.

Para el **Control positivo**: Se agregó 50  $\mu$ L de la solución con DNAasa I (3000 U/mL de DNAasa, en buffer 50mM tris-HCL, pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml BSA) se cubrieron los cortes con parafilm y se incubaron por 10 min, después, se lavaron tres veces con buffer PBS 1X cada uno por tres minutos, se agregó 50  $\mu$ L de la reacción de TUNEL (con enzima TdT, nucleótidos y fluorocromo) se cubrieron con parafilm y se incubaron por 1:30 h en una cámara húmeda, en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó cada una de las muestras 4 veces con buffer PBS 1X por 3-5 min a temperatura ambiente (se mantuvieron en oscuridad entre cada lavado). Se montaron con medio de montaje DAKO más DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) en proporción 5:1 y se sellaron con barniz de uñas.

Para el **Control negativo**: Se agregaron 50µL de la solución de marcaje (sin enzima), se cubrió la muestra con parafilm y se incubó por 1:30 h en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó cada una de las muestras 4 veces con buffer PBS 1X por 3-5 min a temperatura ambiente (se mantuvo en oscuridad entre cada lavado). Se montó con medio de montaje DAKO más DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) en proporción 5:1 y se selló con barniz de uñas.

Las preparaciones se guardaron a 4 °C en oscuridad y fueron observadas en el microscopio Confocal Olympus FV1000.

En la Figura 2 se resumen las técnicas empleadas para detectar las evidencias morfológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas de no funcionalidad y muerte celular programada en el gineceo las flores femeninas y masculinas de la especie estudiada.

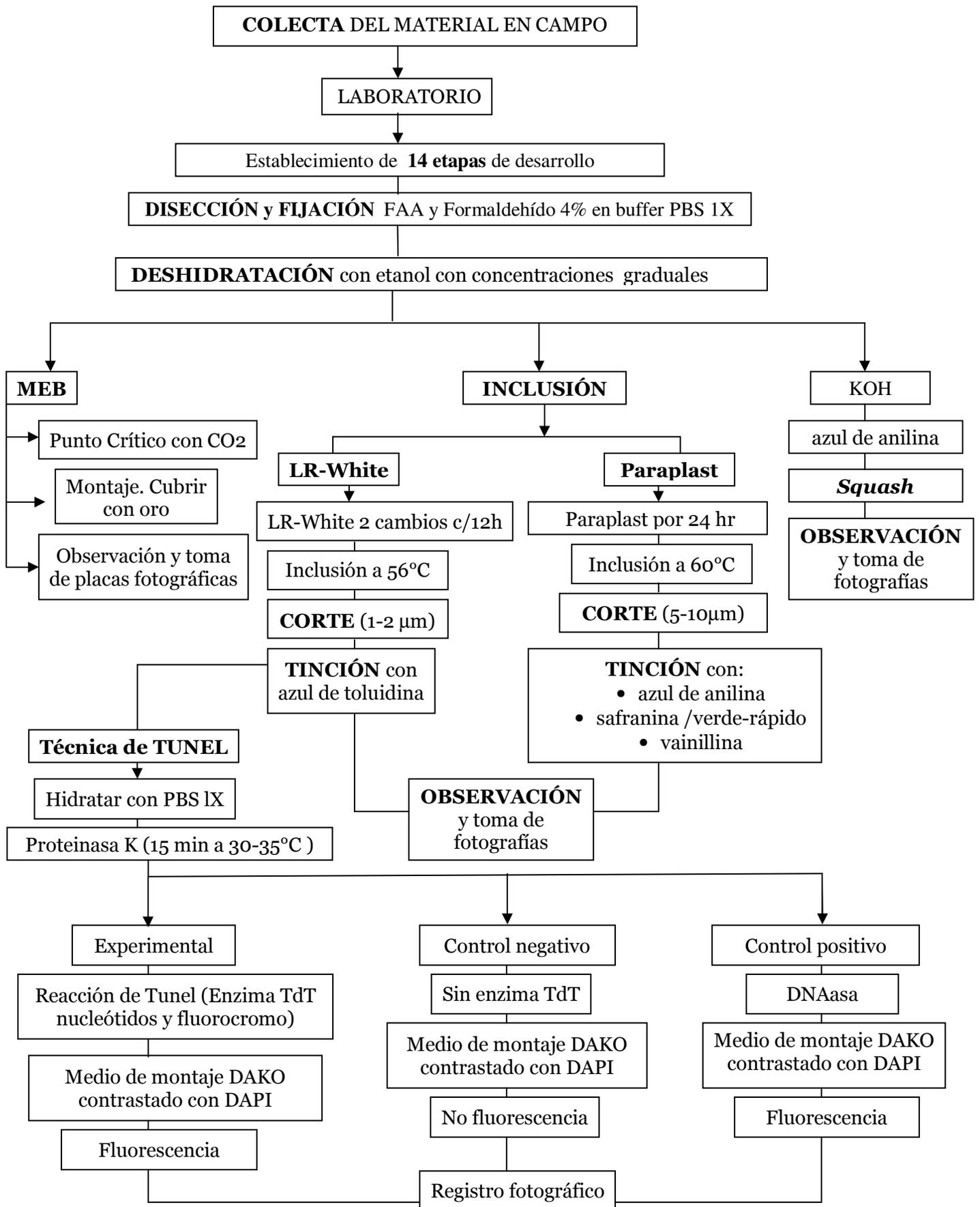


Fig. 2. Esquema que resume los procedimientos para detectar evidencias de no funcionalidad del gineceo en las flores funcionalmente unisexuales de *O. robusta*.

# RESULTADOS

En esta sección se describe el desarrollo morfológico y anatómico del gineceo en flores funcionalmente unisexuales de una población dioica de *Opuntia robusta*. Asimismo, se describen las evidencias que permiten determinar la no funcionalidad de este verticilo sexual y se muestran las etapas del desarrollo que permiten describir la anatomía del gineceo en las flores funcionalmente masculinas y funcionalmente femeninas las cuales se referirán desde este punto como flores masculinas y femeninas respectivamente.

## DESARROLLO DEL ESTILO

Se observó mediante el MEB y cortes histológicos la morfología y anatomía del estilo de las flores masculinas y femeninas en sus diferentes etapas de desarrollo. A continuación se describe la anatomía y las estructuras observadas de ambos tipos florales.

### **Flores femeninas**

En las flores femeninas se observó un estilo de tipo hueco, es decir, en su parte central se ubica el canal estilar (Fig. 3a). Este está delimitado por las células de la epidermis papilosa interna del estilo (Fig.3b) estas células se alargan radialmente (Fig. 3c), tienen un citoplasma denso, con taninos y van disminuyendo su tamaño conforme se alejan del estigma hacia la base del estilo, de tal manera que a la mitad del canal estilar estas células ya no son tan alargadas (Tabla 2).

En los cortes transversales del estilo de flores femeninas se muestran los estratos celulares que lo constituyen. En el centro de esta estructura se observan las células del canal estilar seguidas del tejido de transmisión, éste compuesto por cerca de once estratos celulares, los cuales se distinguen fácilmente debido a que sus células son más pequeñas y sus núcleos son muy evidentes (Fig. 4a). A continuación del tejido de transmisión se encuentran las células del córtex que conforme avanza el desarrollo van

diferenciándose en células de mucílago y se localizan a todo lo largo del estilo, en esta zona se localizan los haces vasculares y al margen la epidermis externa (Fig. 4b).

En la parte apical del estilo, se observa el canal estilar bastante amplio, rodeado por las células del tejido de transmisión y en la parte basal del estilo el canal estilar está más cerrado y las células del tejido de transmisión son más pequeñas (Fig. 4c).

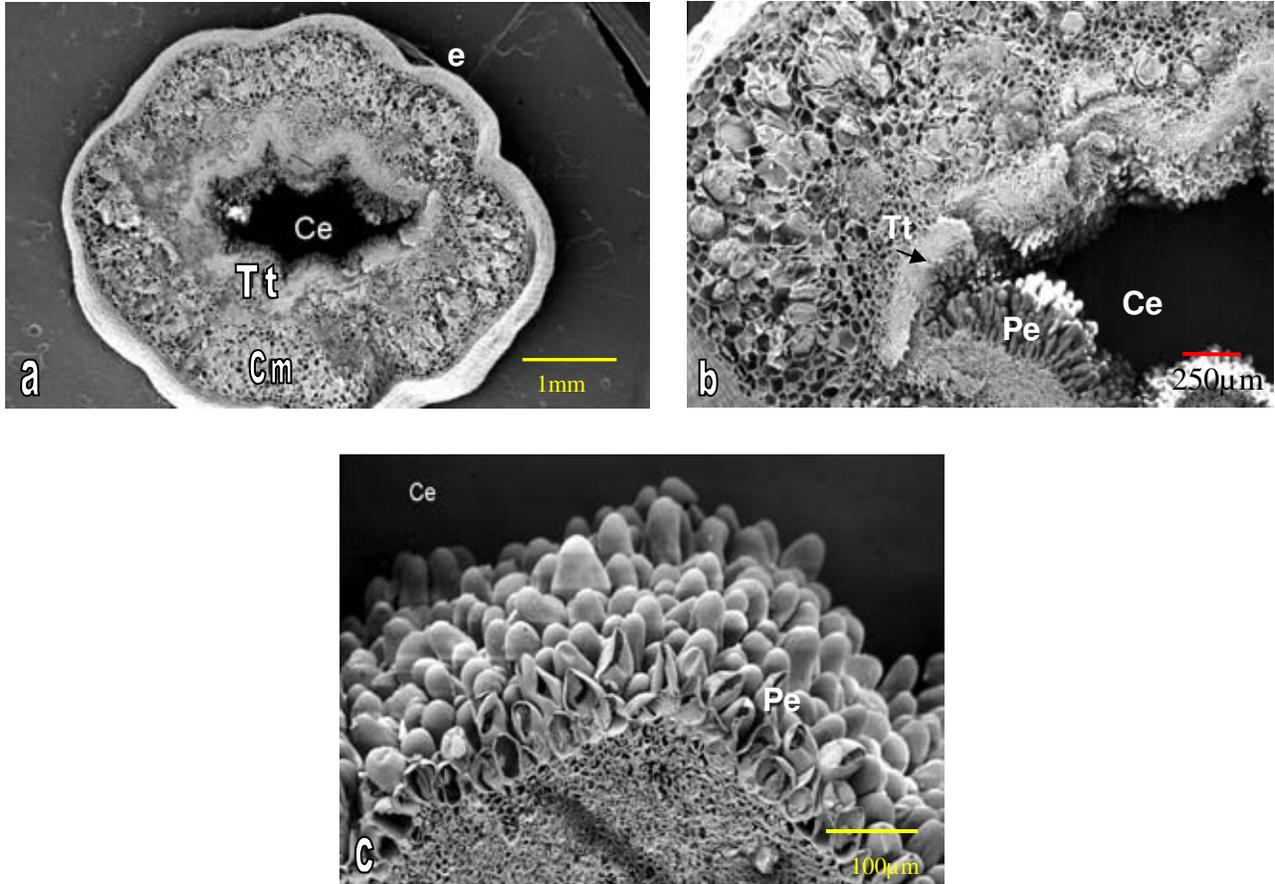


Figura 3. Corte transversal del estilo de flores femeninas en etapa 5. **a.** Se observa un estilo con un canal estilar bastante amplio, con tejido de transmisión alrededor de éste (MEB 15x). **b.** Acercamiento al canal estilar mostrando las células papiladas de la epidermis interna del estilo, las cuales se alargan radialmente (MEB 50x). **c.** Acercamiento a la epidermis papilosa interna del estilo (MEB 200x). **Ce**, canal estilar; **Cm**, células de mucílago; **e**, epidermis externa; **Pe**, células de la epidermis interna en forma de papilas; **Tt**, células del tejido de transmisión.

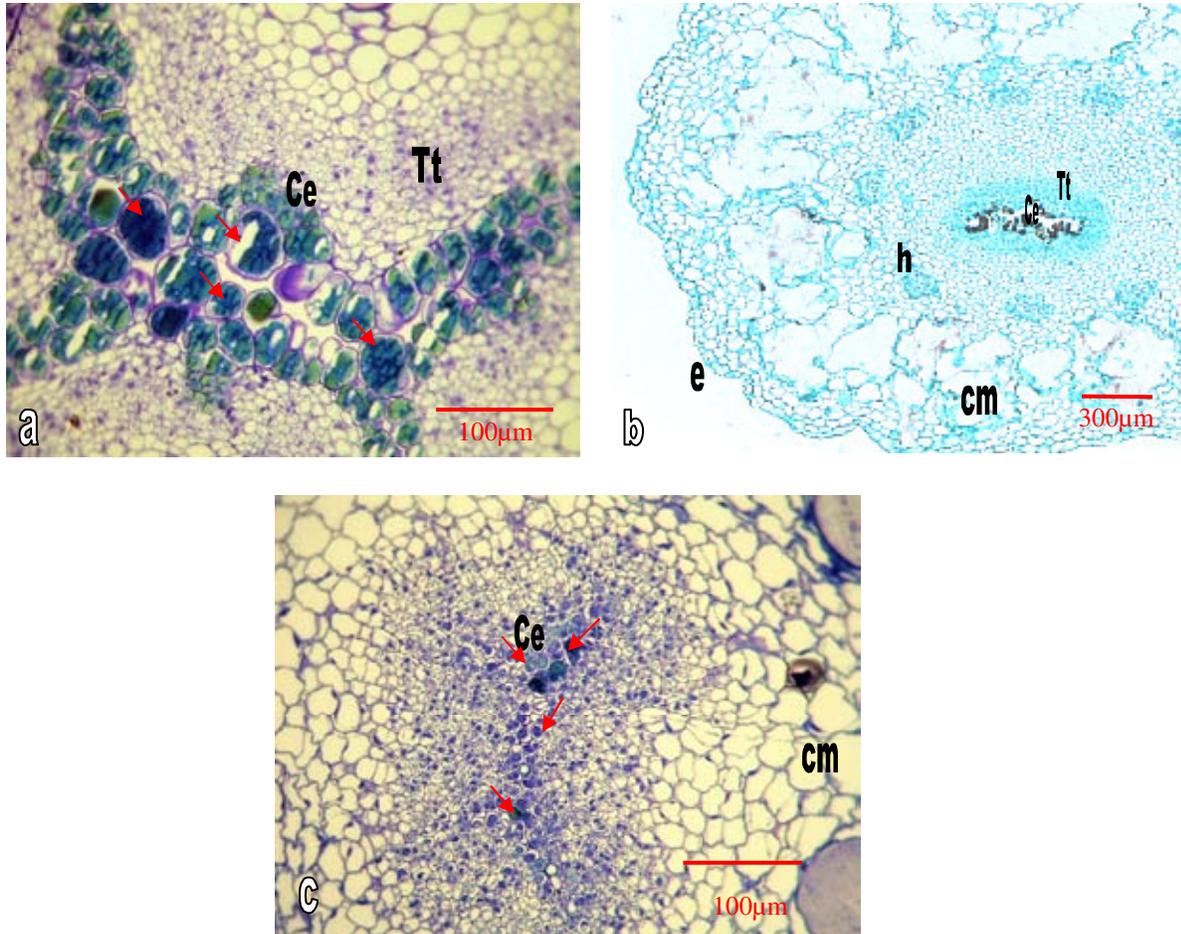


Figura 4. Cortes transversales de estilos de flores femeninas. **a.** Parte apical del canal estilar mostrando células papilosas (flechas) de mayor tamaño y citoplasma denso mientras que en el tejido de transmisión se observan células pequeñas con núcleos evidentes (Etapa 10, 40x). **b.** Se observan del centro hacia afuera los estratos celulares que conforman el estilo, las células del canal estilar, el tejido de transmisión, las células del córtex, los haces vasculares y la epidermis externa (Etapa 11, 10x). **c.** Parte basal del estilo, el canal estilar se observa más cerrado, las células papilosas de la epidermis interna (flechas) son más pequeñas y las células de mucílago son muy grandes (Etapa 10, 40x) **Ce**, células del canal estilar; **cm**, células de mucílago; **e**, epidermis externa; **h**, haz vascular; **Tt**, células del tejido de transmisión.

Tabla 2. Cuadro comparativo de semejanzas y diferencias morfológicas entre las estructuras del gineceo de las flores funcionalmente unisexuales de *Opuntia robusta*.

ESTRUCTURA		FLORES FUNCIONALMENTE FEMENINAS	FLORES FUNCIONALMENTE MASCULINAS	
ESTIGMA		Funcional Tamaño normal 10mm diám	Funcional Reducido el longitud y diámetro 2.5mm diám.	
	Papilas estigmáticas	Juveniles redondeadas Maduras alargadas Citoplasma denso con taninos	Pequeñas Juveniles redondeadas Maduras alargadas Citoplasma denso con taninos	
	Lóbulos estigmáticos	9 – 10 Divergentes	6 – 8 Reducidos	
	Haces vasculares	1 por lóbulo		
ESTILO		Mayor diámetro Menor longitud	Menor diámetro Mayor longitud	
	Parte apical	Canal estilar	Bastante amplio	
		Cél. Epidermis interna	Papiladas Alargadas Citoplasma denso con taninos	
	Parte basal	Canal estilar	Más cerrado	
		Céls. Epidermis interna	Redondeadas Pequeñas	
	A Todo lo largo	Tejido de transmisión	Funcional 11 estratos celulares	Funcional 6-7 estratos celulares
		Córtex	Células grandes Con mucílago	
		Haces vasculares	11	
Epidermis		Uniestratificada		
OVARIO	Lóculo	Muy grande	Reducido	
	Óvulos	Campilótrofos numerosos Normalmente desarrollados	Ausentes o Primordios sin mayor diferenciación. Raros los que llegan a la madurez, pero no funcionales	

## **Flores masculinas**

En los cortes transversales de los estilos de las flores masculinas se observaron los diferentes estratos celulares que lo conforman. En el centro de éste se encuentra el canal estilar, de células papiladas de la epidermis interna (Fig. 5a). Las papilas son cilíndricas, con taninos, generalmente más largas que las encontradas en los estilos de las flores femeninas (Fig. 5b). Adyacente a esta epidermis se ubican seis o siete estratos celulares del tejido de transmisión (Fig. 5c, Tabla 2), seguido de las células del córtex. Muchas de ellas contienen mucílago, en esta zona se sitúan los haces vasculares y finalmente la epidermis externa.

Se observan también las papilas estigmáticas, que en la parte apical del estilo son más alargadas (Fig. 5d) que en la parte basal (Fig. 5e).

## DESARROLLO DEL ESTIGMA

Mediante el MEB y cortes histológicos se observaron los caracteres morfológicos y micromorfológicos de estigmas, lóbulos estigmáticos y papilas estigmáticas de las flores masculinas y femeninas en sus diferentes etapas de desarrollo.

## **Flores femeninas**

Se observaron en los estigmas aproximadamente 10 lóbulos estigmáticos divergentes (Fig. 6a, c). Las papilas estigmáticas son de diferente forma de acuerdo a la etapa de desarrollo, las papilas jóvenes son de apariencia redondeada (Fig. 6b) y conforme avanza el desarrollo éstas se alargan (Fig. 6d, Tabla 2). En etapa de antesis se observan alargadas cubiertas de secreción y con numerosos granos de polen (Fig. 6e). En los cortes transversales del estigma de las flores femeninas se observan los lóbulos estigmáticos (Fig. 7a), con el haz vascular en el centro (Fig. 7b). Cada uno de los lóbulos está delimitado por células de las papilas estigmáticas, las cuales tienen un citoplasma denso y taninos (Fig. 7c).

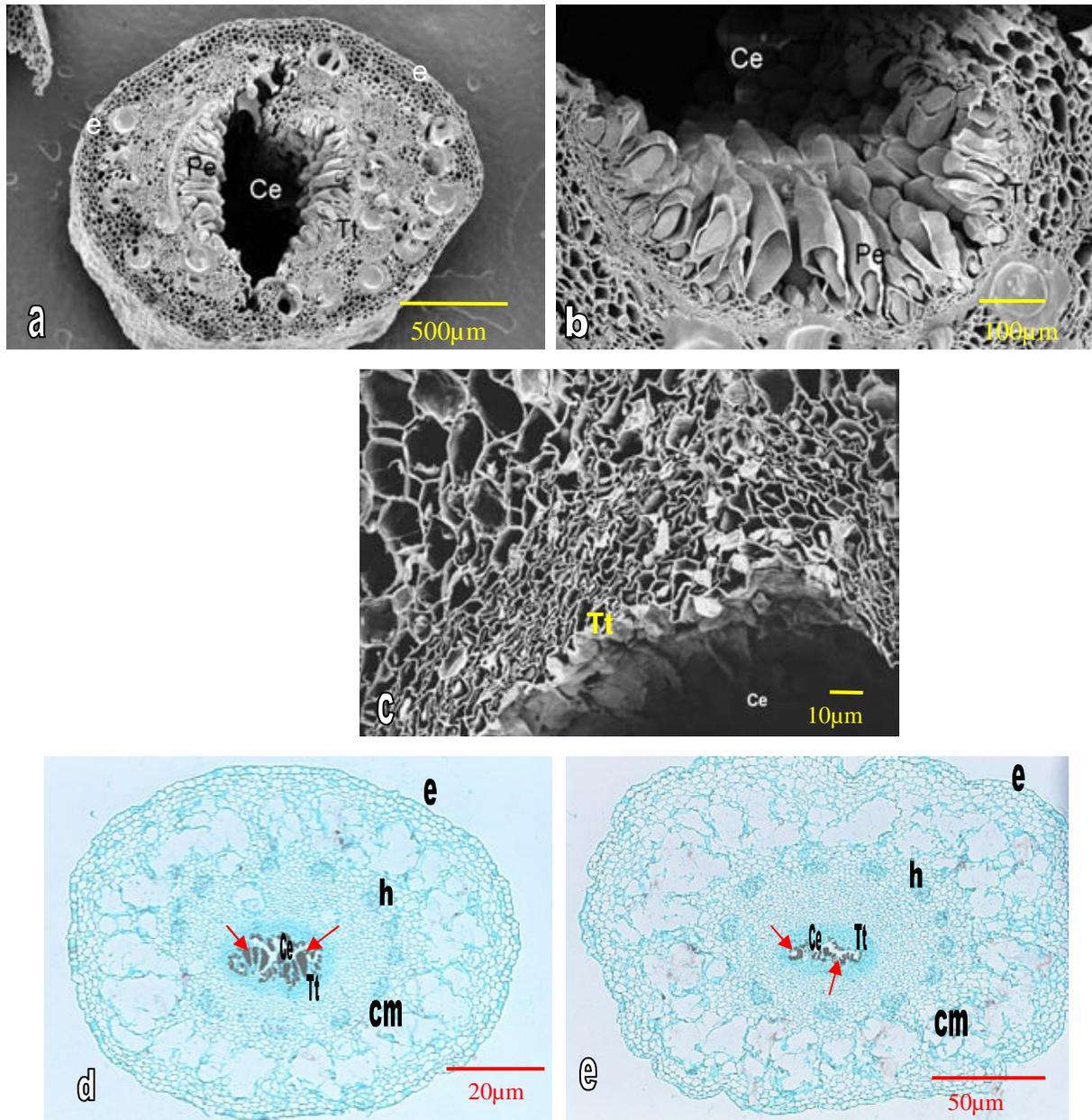


Figura 5. Micrografías al microscopio electrónico de barrido y fotomicrografías en campo claro de cortes transversales de estilos de flores masculinas. **a.** El canal bastante amplio delimitado por las células papiladas de la epidermis interna (Etapa 10, MEB 50x). **b.** Acercamiento al canal estilar, se muestran las células de la epidermis interna en forma de papilas que se alargan radialmente y son más largas que las de las flores femeninas, así como el tejido de transmisión alrededor del canal (Etapa 10, MEB 150x). **c.** Acercamiento al canal estilar en la parte basal, sin papilas, se pueden observar de 6-7 estratos en el tejido de transmisión (Etapa 10, MEB 750x). **d.** Parte apical del estilo, ésta es más delgada y el canal está más abierto, las células papiladas de la epidermis interna (flechas) son más alargadas (Etapa 3, 14x) **e.-** Parte basal del estilo, el canal está más cerrado y las papilas (flechas) son más pequeñas (Etapa 3, 14x) **Ce**, canal estilar; **cm**, células de mucílago; **e**, epidermis externa; **h**, haz vascular; **Pe**, células de la epidermis interna, en forma de papilas; **Tt**, células del tejido de transmisión.

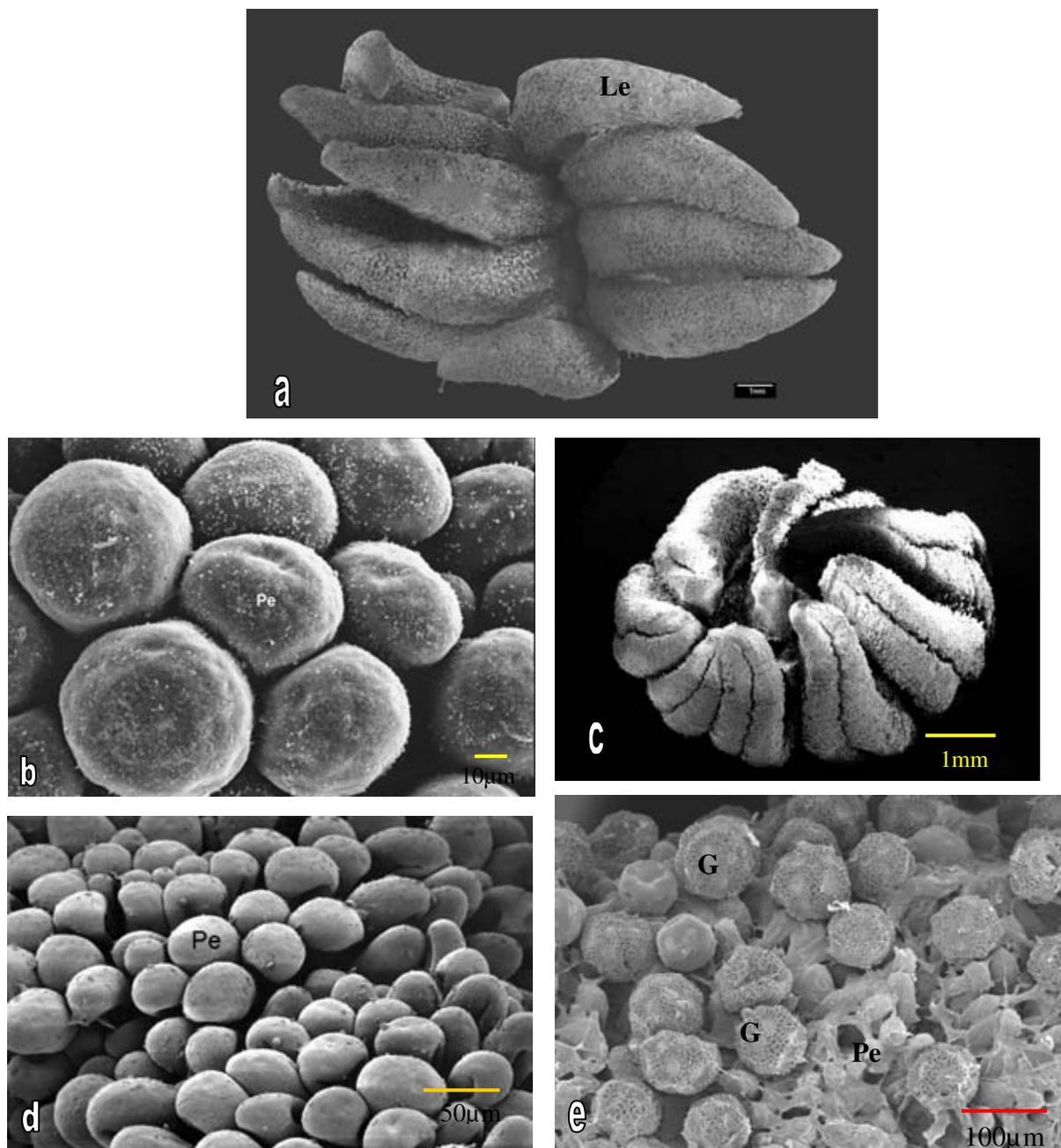


Figura 6. Micrografías al microscopio electrónico de barrido de estigmas y papilas estigmáticas de flores femeninas. **a.** Vista frontal del estigma, se observan 11 lóbulos divergentes (etapa 11, 15x). **b.** Papilas estigmáticas jóvenes, redondeadas (etapa 3, 750x). **c.** Vista frontal del estilo, se observan 8 lóbulos estigmáticos aun cerrados (etapa 6, 15x). **d.** Acercamiento a las papilas estigmáticas, éstas son alargadas (etapa 6, 350x). **e.** Papilas estigmáticas cubiertas de secreción y con numerosos granos de polen (etapa 11, 200x). **G,** granos de polen; **Le,** lóbulos estigmáticos; **Pe,** papilas estigmáticas; **Stg,** estigma; **Stl:** estilo.

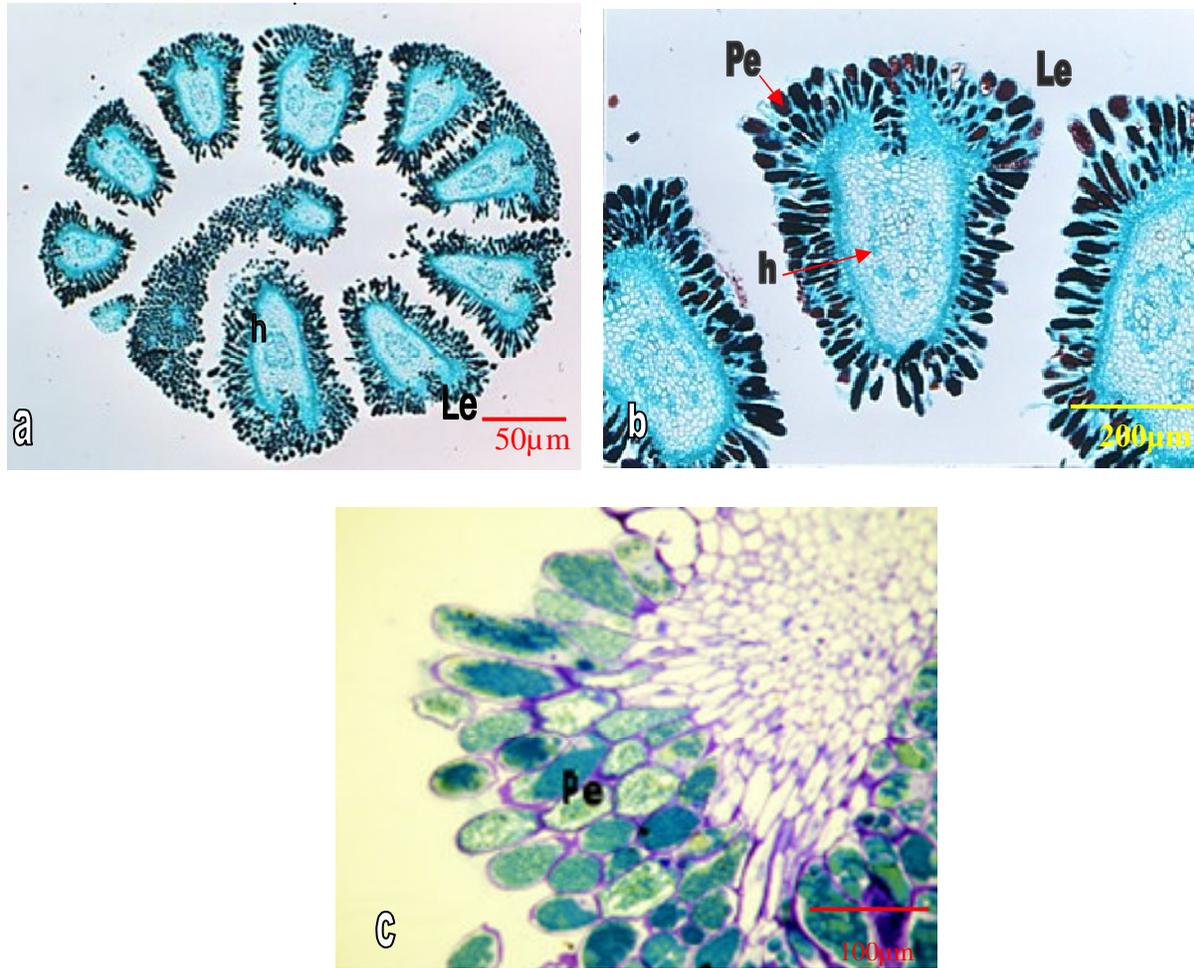


Figura 7. Fotomicrografías en campo claro de cortes transversales de estigmas de flores femeninas. **a** . Se observan 10 lóbulos estigmáticos (Etapa 4, 9x) **b**. Acercamiento a los lóbulos estigmáticos, rodeados por papilas estigmáticas unicelulares y se observa al centro el haz vascular (Etapa 4, 25x). **c**. Acercamiento a las papilas estigmáticas con taninos los cuales se tiñen de verde con azul de anilina (etapa 11, 40x). **h**, haz vascular; **Le**, lóbulos estigmáticos; **Pe**, papilas estigmáticas.

## **Flores masculinas**

En las flores masculinas el estigma está reducido en relación al tamaño (longitud y diámetro) y al número de los lóbulos estigmáticos respecto a lo observado en las flores femeninas (Tabla 2). En los estigmas de las flores masculinas se encuentran de seis a ocho lóbulos (Fig. 8a, b), cada uno con un haz vascular en el centro (Fig. 8c). Las papilas estigmáticas en las diferentes etapas de desarrollo son morfológicamente distintas. En etapas tempranas son redondeadas (Fig. 9a, b) y en etapas posteriores son cilíndricas y más alargadas (Fig. 9c) aunque siempre más pequeñas que las de los estigmas femeninos.

## DESARROLLO DEL OVARIO

Mediante el MEB y cortes histológicos se observaron las cámaras del ovario y óvulos en diferentes etapas de desarrollo de ambos morfos florales.

## **Flores femeninas**

Las flores femeninas de *Opuntia robusta* presentan un ovario con numerosos óvulos (Fig. 10a,b, Tabla 2) campilótropos (Fig. 10c) en diferentes etapas de desarrollo. Los óvulos presentan tricomas en la parte interna del funículo (Fig. 10d,e). En cortes longitudinales de óvulos se observan precipitaciones de mucílago, dos tegumentos externos y están rodeados por el funículo (Fig. 12a).

## **Flores masculinas**

La mayoría de los ovarios de las flores masculinas presentan un lóculo reducido sin óvulos (Fig. 11a, b, Tabla 2). Sin embargo, también hay flores que presentan ovarios con óvulos (Fig. 11c), que no llegan a la etapa de madurez, o permanecen como primordios ovulares alargados (Fig. 11d); En algunas ocasiones el óvulo alcanza la madurez cuando la flor se encuentra en etapa de antesis (Fig. 11e), sin embargo como se explicará más adelante, sus células pueden presentar muerte celular programada. En cortes de óvulos

se observaron precipitaciones de mucílago en los sitios correspondientes al saco embrionario, siendo éstos mayores en los óvulos de flores masculinas, los cuales están reducidos y tienen los tegumentos colapsados (Fig. 12b).

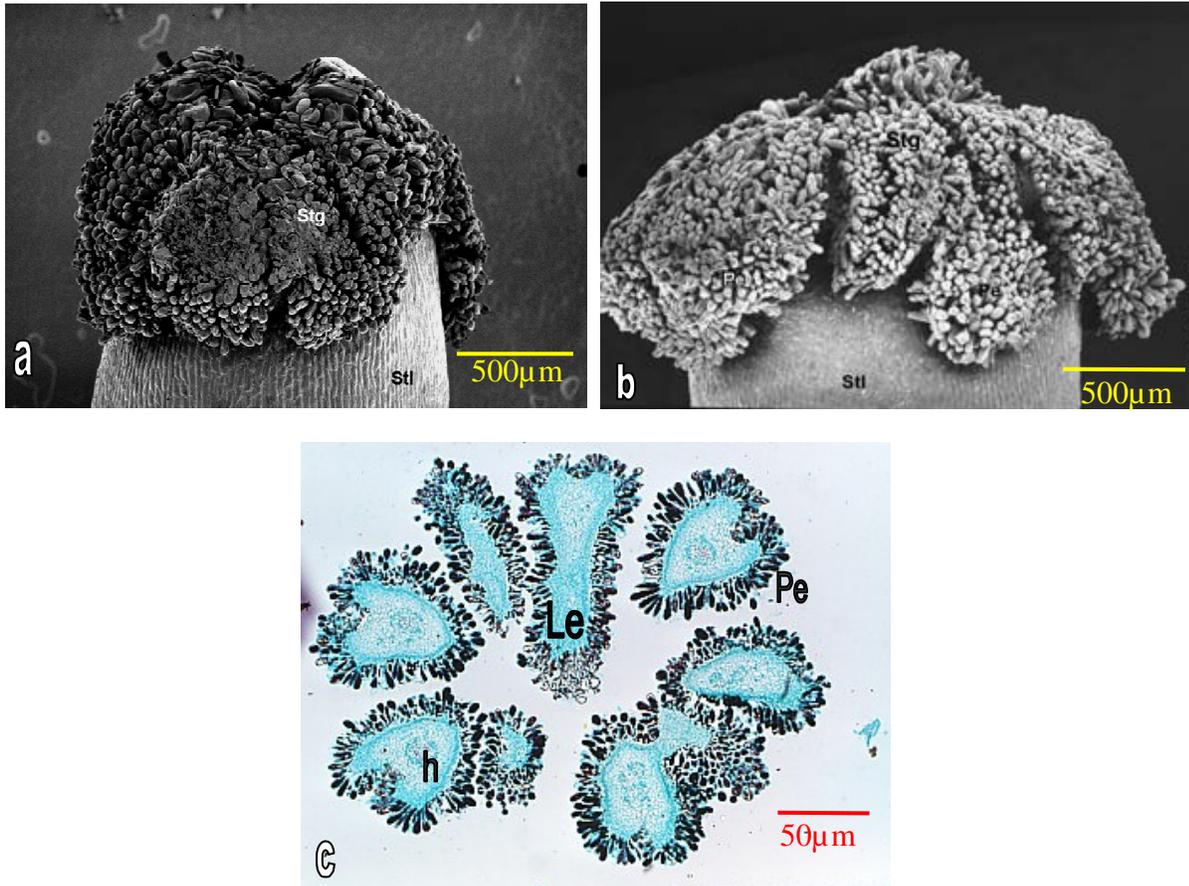
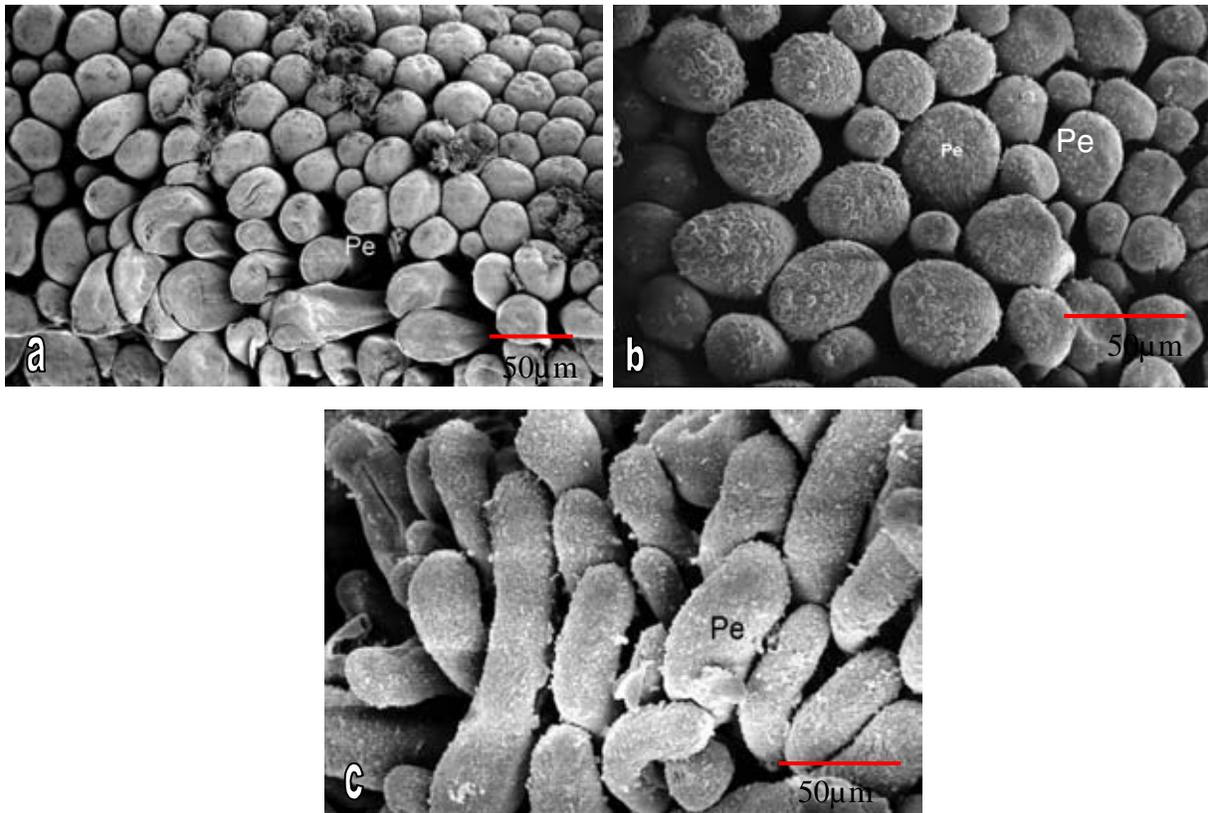


Figura 8. Micrografías al microscopio electrónico de barrido y fotomicrografías en campo claro de estigmas de flores masculinas. **a.** Vista lateral del estigma, se observa reducido en longitud y diámetro en comparación con el de las flores femeninas (Etapa 2, 75x). **b.** Vista lateral del estigma reducido (Etapa 4, 50x). **c.** Corte transversal de estilo, se observan ocho lóbulos, cada uno con un haz vascular central y rodeados por papilas estigmáticas (Etapa 5, 9x). **h**, haz vascular; **Le**, lóbulo estigmático; **Pe**, papilas estigmáticas; **Stg**, estigma; **Stl**, estilo.



---

Figura 9. Micrografías al microscopio electrónico de barrido de papilas estigmáticas de flores masculinas. **a.** Acercamiento a las papilas estigmáticas redondeadas en etapa joven, (Etapa 3, MEB 350x). **b.** Papilas estigmáticas jóvenes redondeadas (Etapa 4, 500x) **c.** Papilas estigmáticas alargadas en etapas avanzadas del desarrollo. (Etapa 9, 350x). Las papilas se observan de menor tamaño respecto a las femeninas **Pe**, papilas estigmáticas.

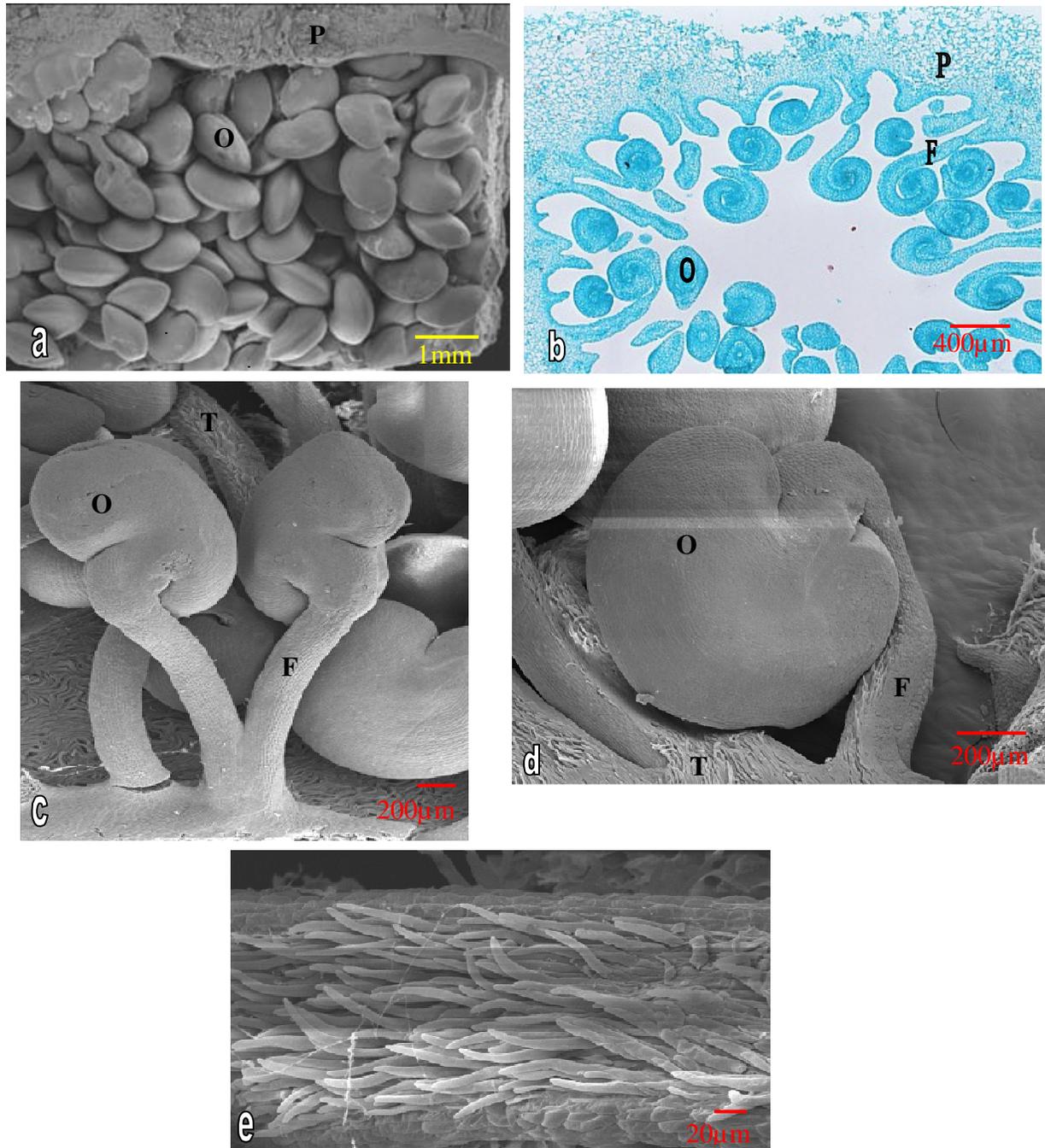


Figura 10. Micrografías de ovarios y óvulos de flores femeninas al microscopio electrónico de barrido y microscopía fotónica en campo claro. **a.** Se observa un ovario con gran cantidad de óvulos normalmente desarrollados (Etapa 11, MEB 15x) **b.** Corte transversal de un ovario con numerosos óvulos (Etapa 4, 62.5x) **c.** Óvulos, campilótropos (Etapa 11, MEB 50x) **d.** Acercamiento a un óvulo, se observan tricomas en la parte interna del funículo (Etapa 11, MEB 75x) **e.** Acercamiento a los tricomas (Etapa 11, MEB 350x). **F,** funículo; **O,** óvulo; **P,** placenta; **T,** tricomas.

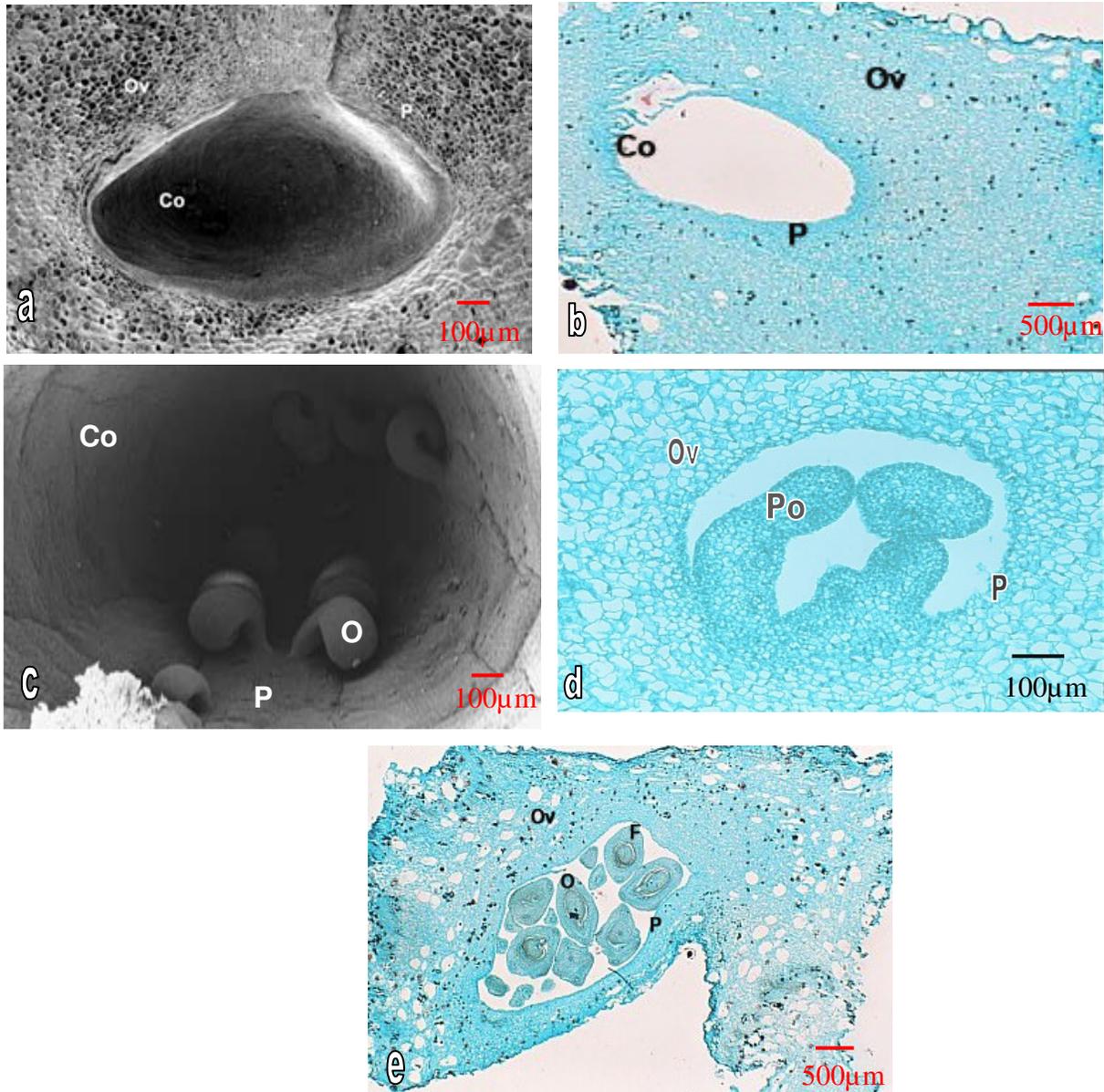


Figura 11. Micrografías de ovarios y óvulos de flores masculinas al microscopio electrónico de barrido y fotomicroscopía en campo claro. **a.** Se observa la cámara ovulífera reducida y sin óvulos (Etapa 2, MEB 75x) **b.** Cavidad del ovario, se observa vacía y reducida en comparación con **e** (Etapa 13 antesis, 5x). **c.** Se observa el lóculo del ovario con algunos óvulos inmaduros (Etapa 10, MEB 75x). **d.** El ovario no desarrolla óvulos, sólo se observan primordios ovulares alargados y sin mayor diferenciación (Etapa 6, 25x). **e.** Se observan óvulos maduros no funcionales en el lóculo del ovario, no son funcionales y en menor cantidad respecto a los femeninos (Etapa 13 antesis, 5x). **Co:** cámara ovulífera. **F:** funículo. **O:** óvulo. **Ov:** pared del ovario. **P:** placenta. **Po:** primordios ovulares.

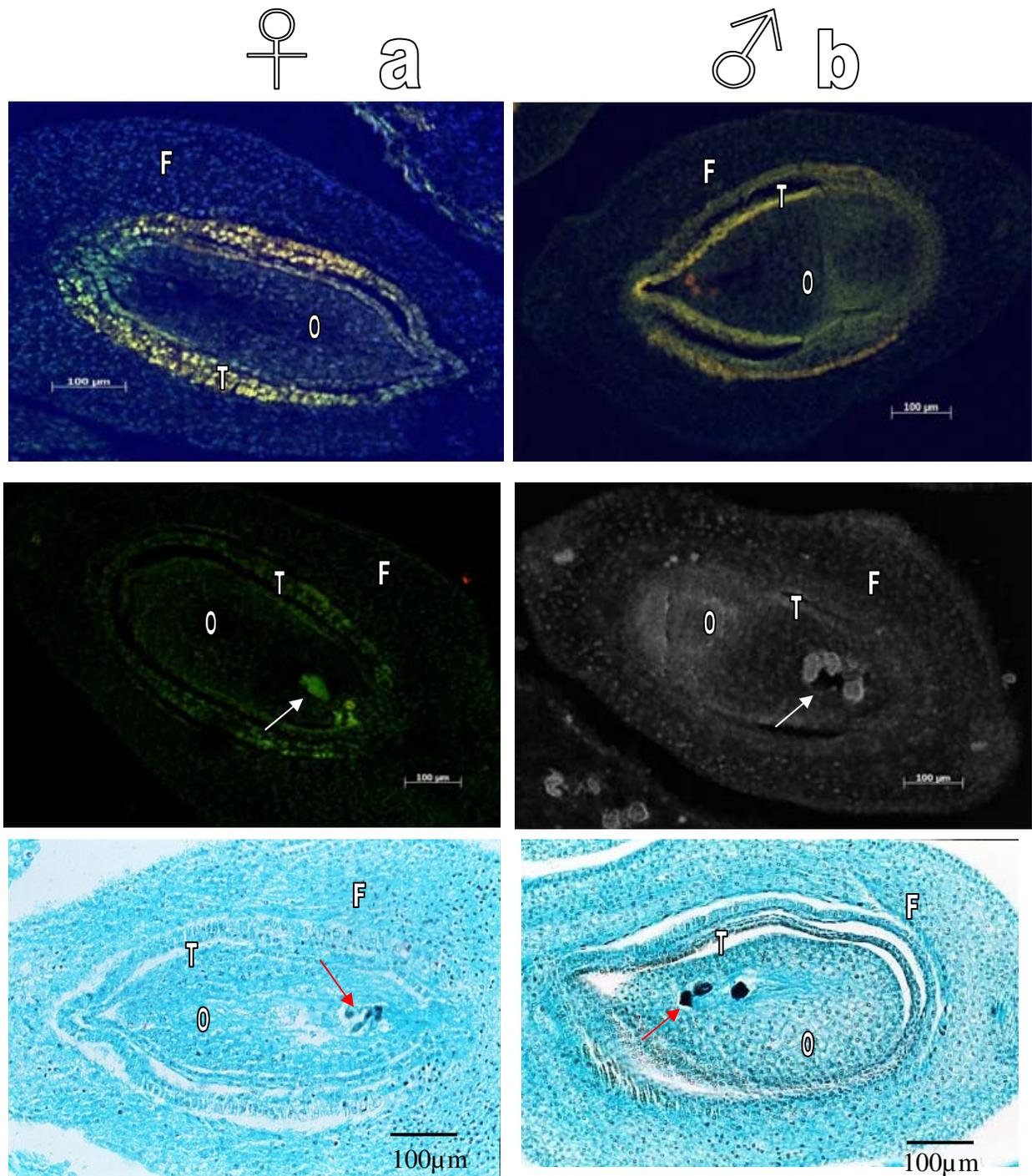


Figura 12. Fotomicrografías de fluorescencia y fotónica en campo claro de óvulos de flores femeninas **a** y masculinas **b**. Se muestran los óvulos bitégmicos y el funículo (Etapa 13, 40x). **F**, funículo; **O**, óvulo; **T**, tegumentos. Las flechas indican precipitaciones de mucílago en el interior de los óvulos.

## TRAYECTORIA Y CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS EN EL GINECEO

Con la finalidad de conocer si los estilos de las flores masculinas son funcionales y permiten el crecimiento de los tubos polínicos se analizaron estilos de ambos morfos florales que fueron polinizados manualmente con polen proveniente de flores masculinas, así como también estilos de flores masculinas y femeninas en etapas de post-antesis. Igualmente se investigó el trayecto de los tubos polínicos a través del estilo, ya que no existe información al respecto en cactáceas.

En los estigmas de ambos morfos florales de *Opuntia robusta* se observaron granos de polen germinando (Fig. 13a,b). En el tejido de transmisión se observaron creciendo tubos polínicos, no sólo en flores femeninas (Fig 13c,e) sino también en flores masculinas (Fig. 13d,f), así como en las zonas en las zonas cercanas a la base del estilo. Existe diferencia entre la funcionalidad de ambos morfos ya que los tubos polínicos se encontraron creciendo siempre en mayor número en los estilos femeninos (Fig. 14a) que en los masculinos (Fig. 14b).

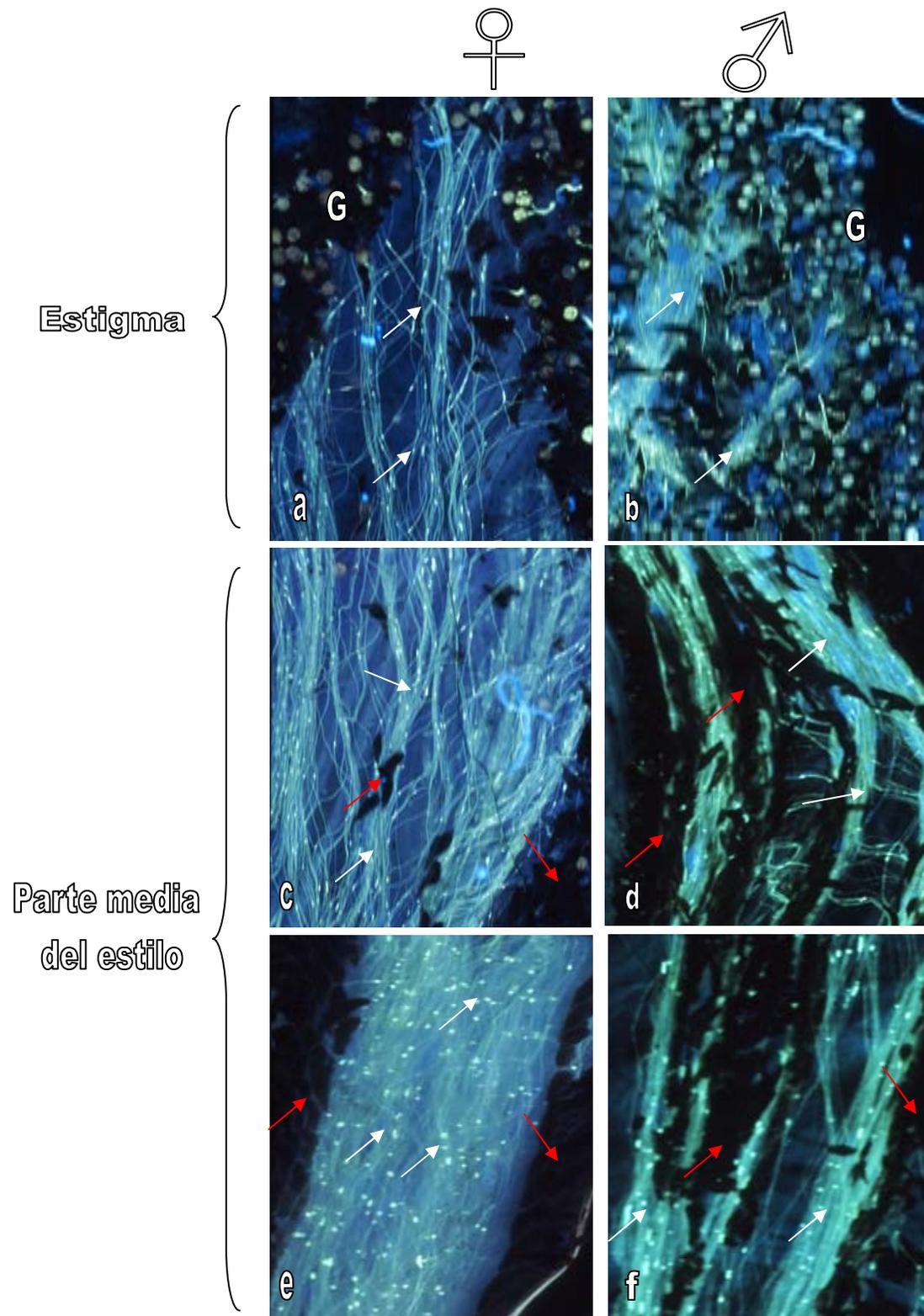
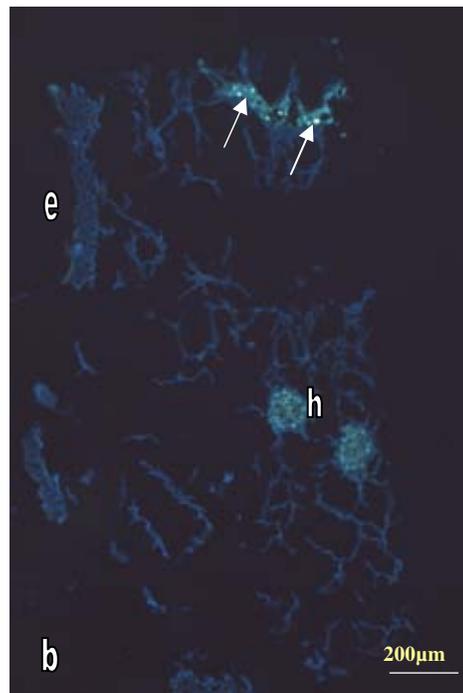
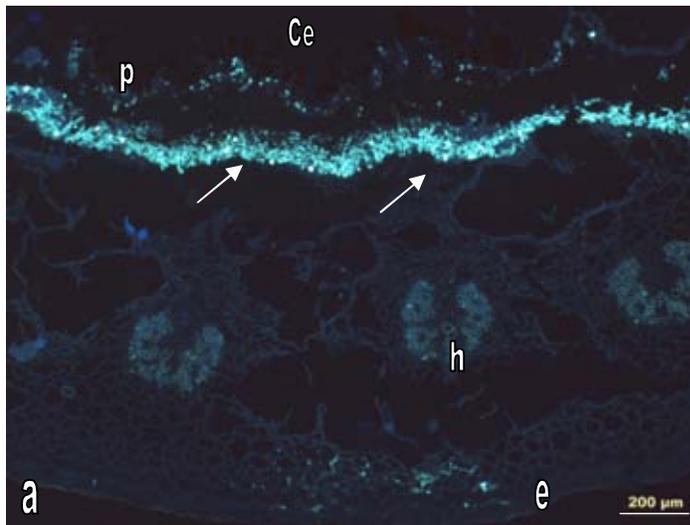


Figura 13. Fotomicrografías en fluorescencia de estigmas y estilos de flores masculinas y femeninas en etapa 14. Se muestran los tubos polínicos. **a.** Estigma de flor femenina con granos de polen germinando. **b.** Estigma de flor masculina y tejido de transmisión del estilo adyacente al estigma. **c.** Tejido de transmisión del estilo de flor femenina, las células en negro son las células papilares del canal estilar (flechas rojas). **d.** Estilo y tejido de transmisión de flor masculina, hay pocos tubos polínicos en esta área. (10x). **e.** Estilo de flores femeninas con múltiples tubos polínicos. **f.** Estilo de flores masculinas. (20x). **G**, granos de polen; Las flechas blancas indican tapones de calosa resultantes del crecimiento de los tubos polínicos.



---

Figura 14. Fotomicrografías en fluorescencia de cortes transversales de estilo. **a.** Estilo de flor femenina (4x). **b.** Estilo de flor masculina (4x). En ambos se observan los tubos polínicos (flechas) creciendo a través del tejido de transmisión adyacente al canal estilar, siempre en menor número en los estilos de las flores masculinas. Asimismo se observan diferentes estratos de células mucilaginosas en el córtex. **Ce**, canal estilar; **e**, epidermis; **h**, haz vascular; **p**, células papilares de la pared interna del estilo.

## DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Mediante la técnica (tinción) de TUNEL se determinó si hay muerte celular programada en el gineceo de las flores masculinas. Se observaron los núcleos de las células de estigmas, estilos, ovarios y óvulos cuando estos se presentaron, en diferentes etapas de desarrollo, asimismo se analizaron estas mismas estructuras en las flores femeninas. Las muestras se contrastaron con DAPI, el cual tiñe los núcleos, comparando las dos tinciones, se pudieron obtener los resultados que se describen a continuación.

### **Controles de la prueba de TUNEL**

Para las muestras control se utilizaron estilos de flores masculinas, al control positivo se le agregó previamente a la reacción de TUNEL, DNAasa, la cual fragmenta el DNA y nos da una referencia de lo que se quiere observar, es decir, núcleos con la tinción doble (Fig.15). Al control negativo no se le agrega la enzima TdT, que es la encargada de unir los nucleótidos y el fluorocromo a los núcleos, de esta manera no se observa la fluorescencia en los núcleos (Fig.16).

### **Flores masculinas**

Los resultados de estas pruebas indican que, en las células de los estigmas de las flores masculinas en las etapas 5, 6, y 8 no existe el DNA fragmentado en las células adyacentes a las papilas estigmáticas (Figs. 17, 18).

En los estilos de flores en etapas 1, 3, 5, 6 y 8 no se observa el DNA fragmentado en las células del tejido de transmisión ni en las células adyacentes a éstas, sin embargo en dos individuos de la etapa 2 y 4 se detectaron evidencias de muerte celular programada en las células del córtex pero no en el tejido de transmisión (Figs. 19 - 21).

Los ovarios de las flores masculinas en las etapas tempranas de desarrollo no presentaron muerte celular programada, esto en las etapas 2-5, sin embargo en algunos

individuos de etapas tempranas se encontró DNA fragmentado en algunas células, y en etapas más avanzadas, el número de células con DNA fragmentado era mayor, los individuos de etapas 6, 7 y 13 (antesis) presentan muerte celular programada en la placenta. En el ovario de una flor masculina en etapa de antesis, se encontraron óvulos en etapa madura, pero de acuerdo a estas pruebas tanto el tejido del funículo y la nucela presentan muerte celular programada (Figs. 22,23).

## **Flores femeninas**

Con la finalidad de descartar que la muerte celular programada se presenta también en las flores femeninas, se analizó el gineceo de éstas en etapas jóvenes y avanzadas (etapas 4, 6 y 11).

En las células adyacentes a las papilas estigmáticas no se observó muerte celular programada en los botones de la etapa 4 (Fig. 24). En los estilos de las flores femeninas, no se observó la existencia de la muerte celular programada en las células del tejido de transmisión pero al igual que en las flores masculinas se observó evidencia de muerte celular programada en las células del córtex (Fig. 25); en ovario y óvulos de las flores masculinas no se observaron evidencias de muerte celular programada (Fig. 26).

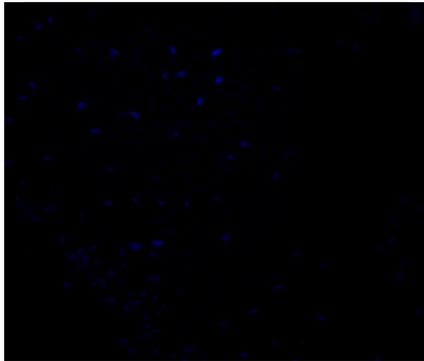
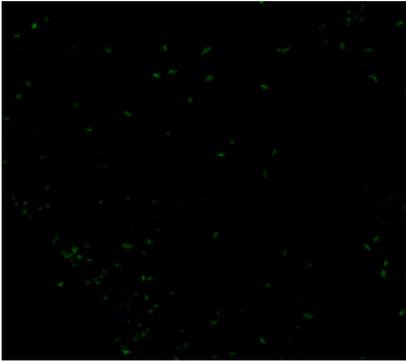
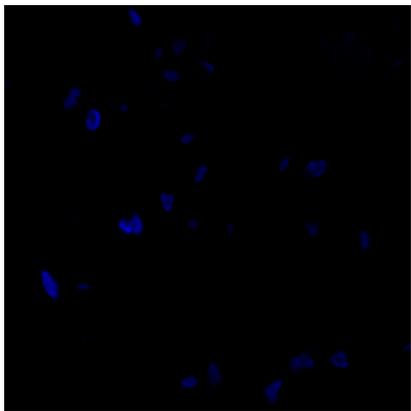
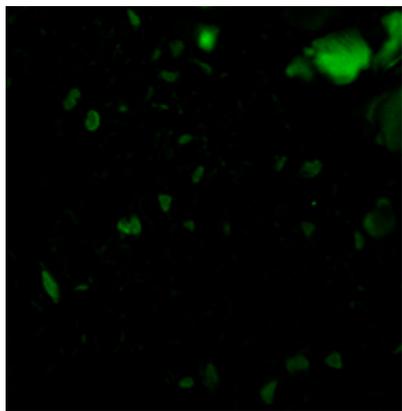
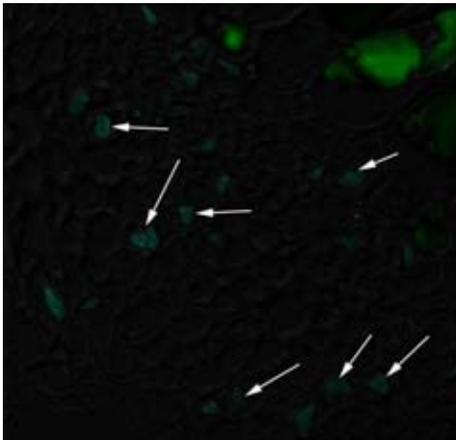
CONTROLES	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes sobrelapadas
Control Positivo			
Control Positivo			

Figura 15. Control Positivo. A este tejido se le agrega DNAasa para observar en todos los núcleos la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido, las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

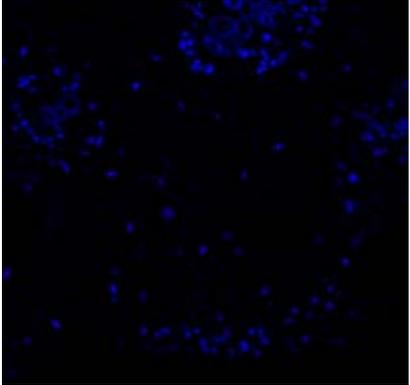
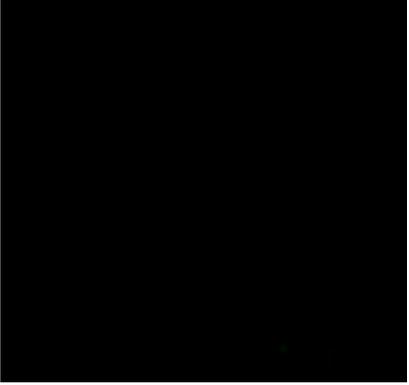
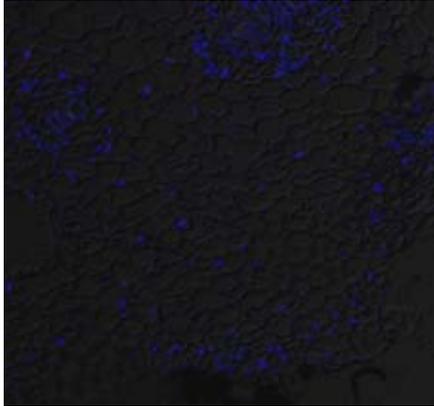
CONTROLES	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
Control negativo			

Figura 16. Control Negativo. A este tejido no se le agrega la enzima TDT por lo que en la tinción de TUNEL no se observan núcleos fluorescentes. La tinción de DAPI (azul) evidencia los núcleos. En las imágenes superpuestas no se observan núcleos con DNA fragmentado.

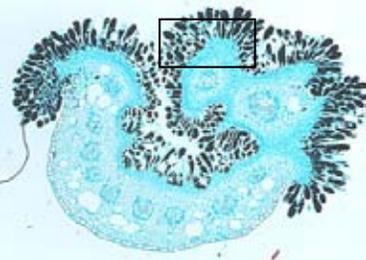
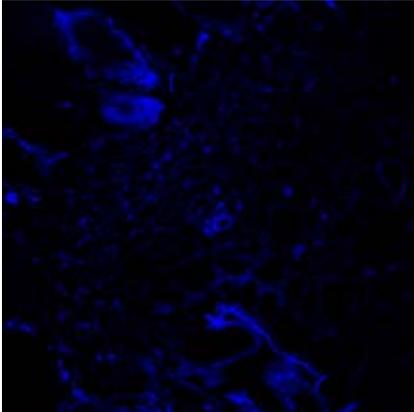
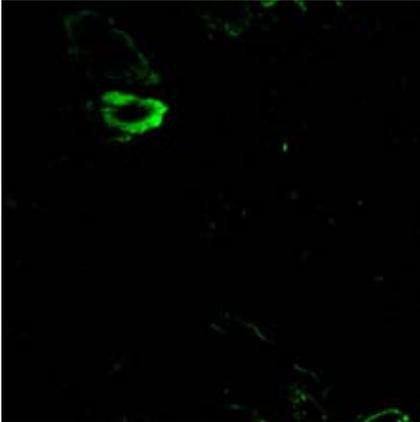
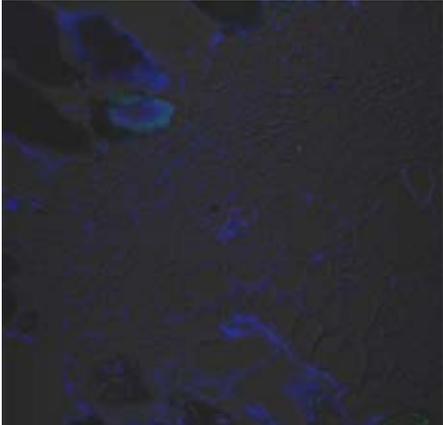
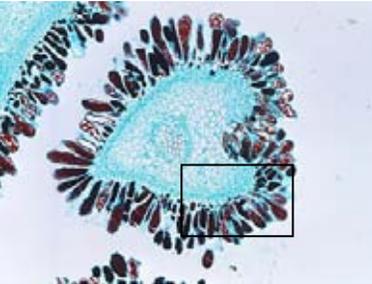
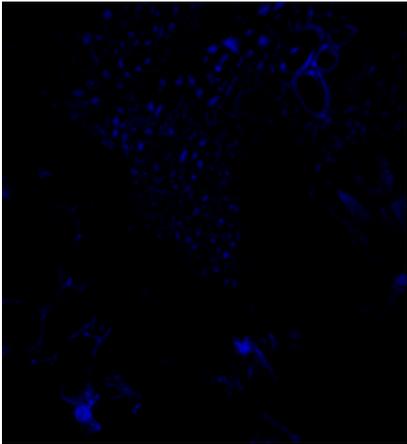
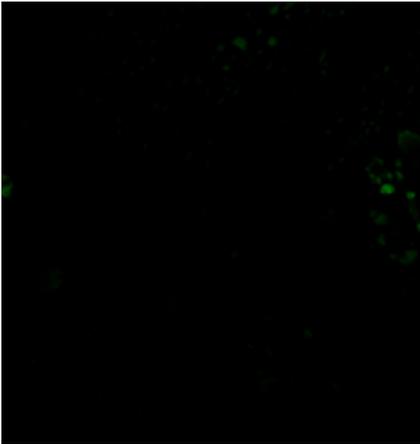
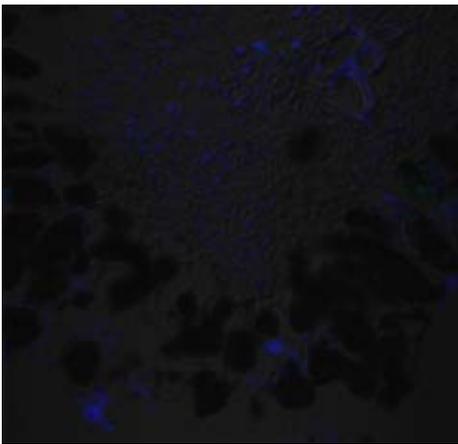
<p><b>ESTIGMA</b> <b>Flores Masculinas</b></p>	<p><b>Tinción de DAPI</b></p>	<p><b>Tinción de TUNEL</b></p>	<p><b>Imágenes superpuestas</b></p>
<p><b>Etapa 5</b></p> 			
<p><b>Etapa 6</b></p> 			

Figura 17. Estigmas de flores masculinas, el recuadro indica el sitio del estigma que se observa en las pruebas. En este tejido no se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes superpuestas no se observan núcleos con DNA fragmentado.

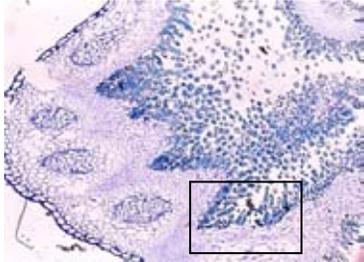
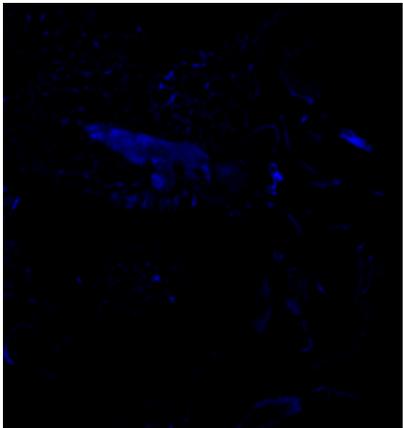
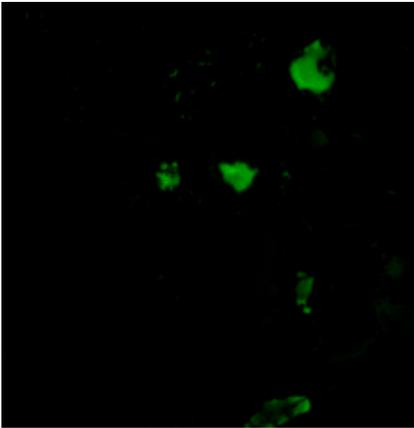
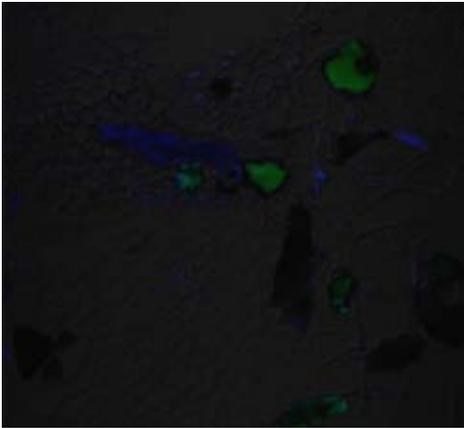
<b>ESTIGMA</b> <b>Flores Masculinas</b>	<b>Tinción de DAPI</b>	<b>Tinción de TUNEL</b>	<b>Imágenes superpuestas</b>
<p data-bbox="262 440 384 472"><b>Etapa 8</b></p> 			

Figura 18. Estigma de flor masculina, el recuadro indica el sitio del estigma que se observa en las pruebas. En este tejido no se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde), se observan papilas estigmáticas autofluorescentes, la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes superpuestas no se observan núcleos con DNA fragmentado.

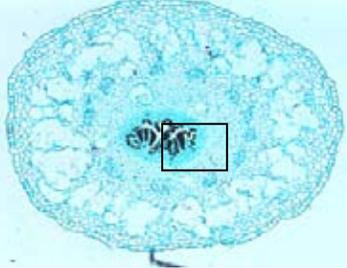
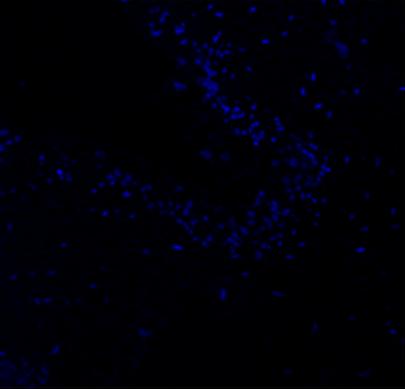
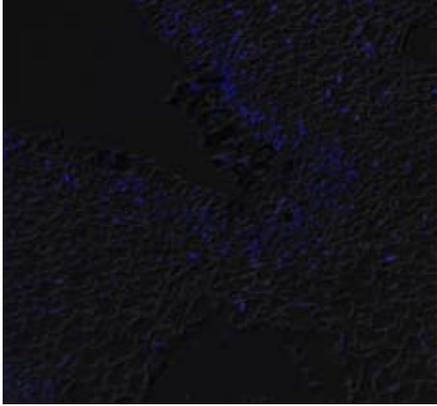
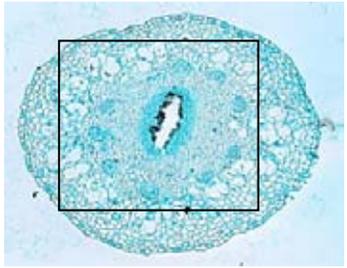
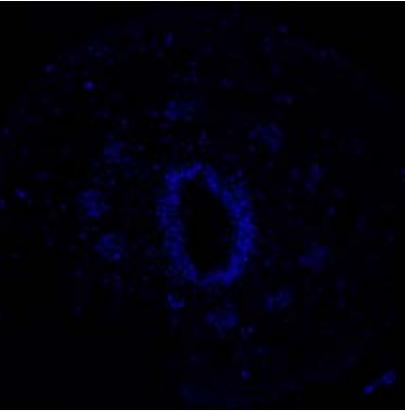
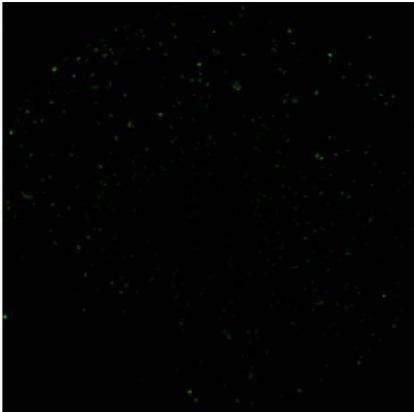
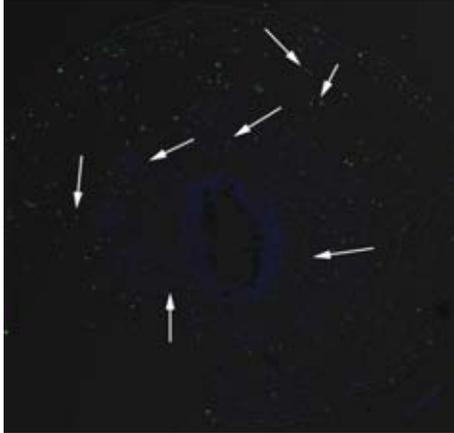
ESTILO Flores Masculinas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p data-bbox="254 342 369 375">Etapa 1</p> 			
<p data-bbox="254 784 369 816">Etapa 2</p> 			

Figura 19. Estilos de flores masculinas. El recuadro indica el sitio del estilo que se observa en las pruebas. En este tejido se observa en los núcleos del córtex la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

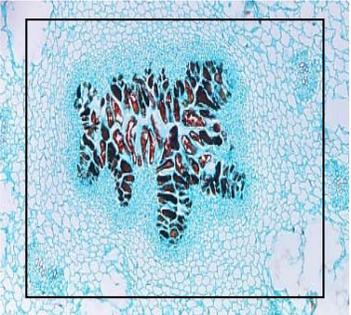
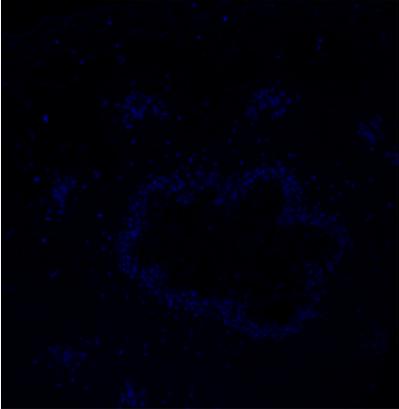
ESTILO Flores Masculinas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p data-bbox="254 448 373 480">Etapa 4</p> 			

Figura 20. Estilo de flor masculina. El recuadro indica el sitio del estilo que se observa en las pruebas. En este tejido se observa en los núcleos del córtex la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

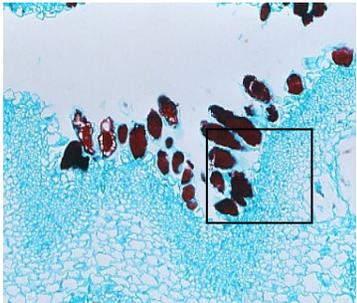
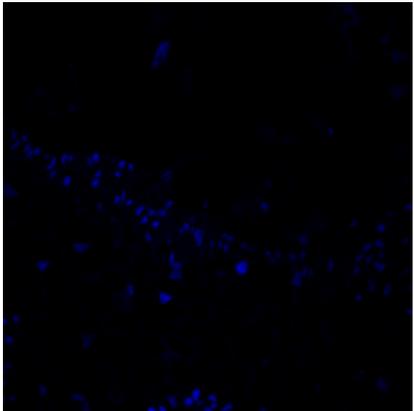
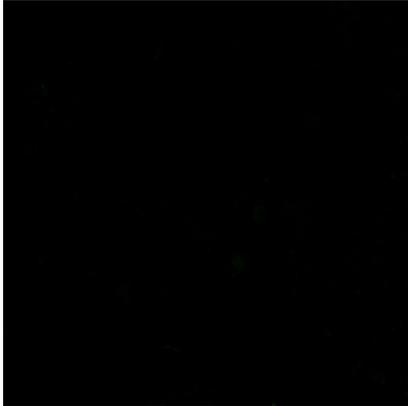
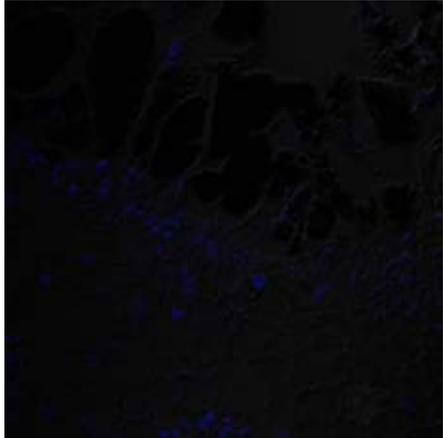
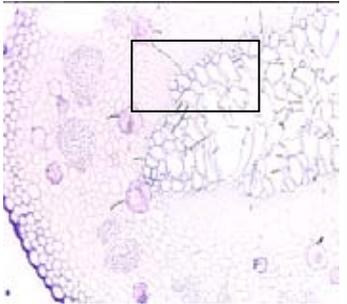
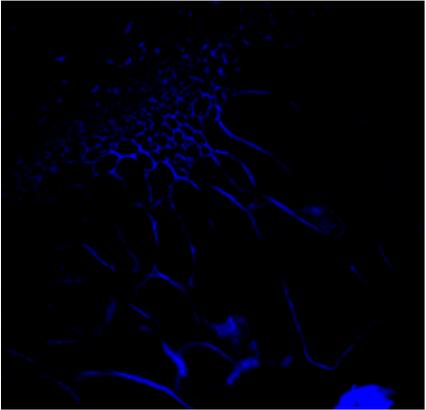
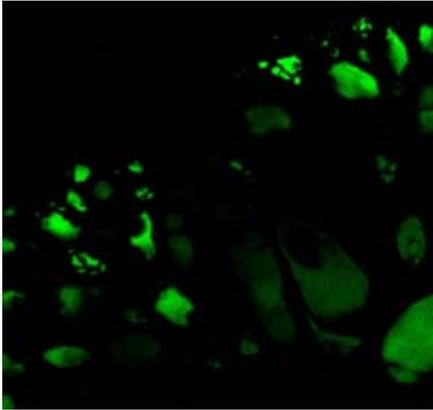
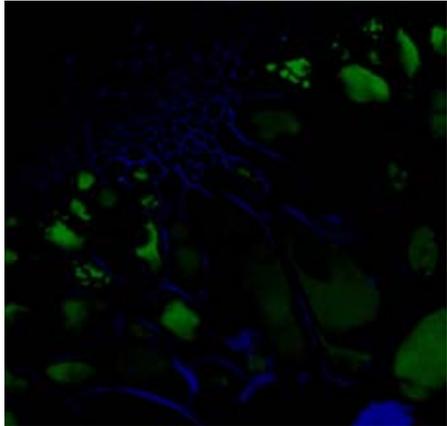
<p align="center"><b>ESTILO</b> <b>Flores Masculinas</b></p>	<p align="center"><b>Tinción de DAPI</b></p>	<p align="center"><b>Tinción de TUNEL</b></p>	<p align="center"><b>Imágenes superpuestas</b></p>
<p align="center"><b>Etapa 5</b></p> 			
<p align="center"><b>Etapa 8</b></p> 			

Figura 21. Estilos de flores masculinas. El recuadro indica el sitio del estilo que se observa en las pruebas. En este tejido no se observa en los núcleos la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), se observan papilas autofluorescentes, la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido. En las imágenes superpuestas no se observan núcleos con tinción doble.

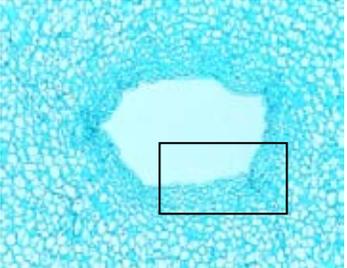
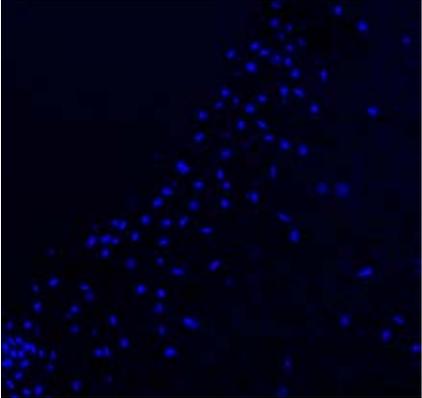
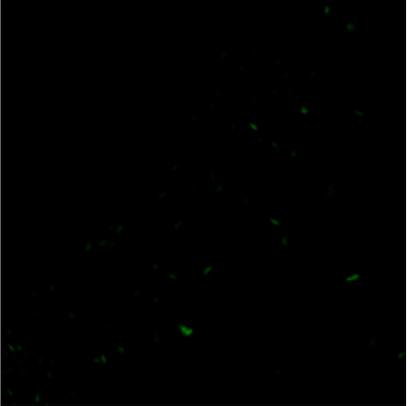
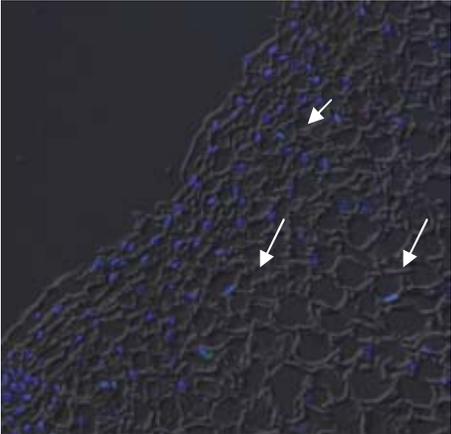
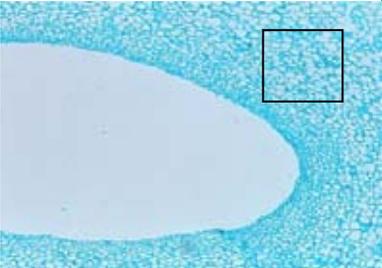
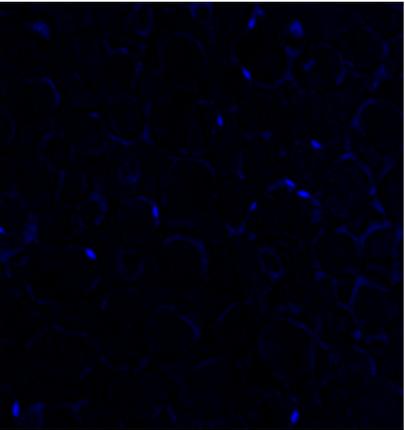
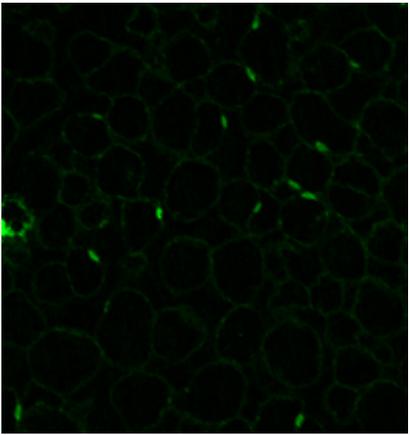
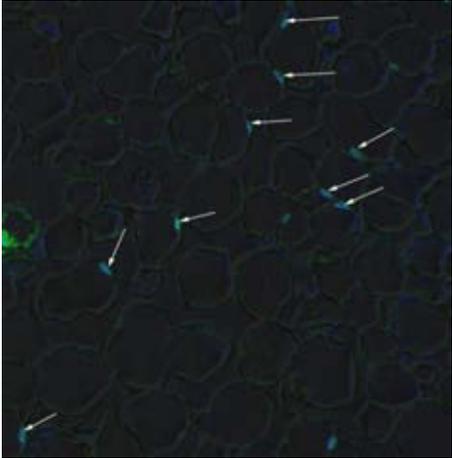
<b>OVARIO</b> <b>Flores Masculinas</b>	<b>Tinción de DAPI</b>	<b>Tinción de TUNEL</b>	<b>Imágenes sobrelapadas</b>
<b>Etapa 2</b> 			
<b>Etapa 7</b> 			

Figura 22. Ovarios de flores masculinas. El recuadro indica el sitio del ovario que se observa en las pruebas. En este tejido se observa en los núcleos la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido. En las imágenes sobrelapadas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

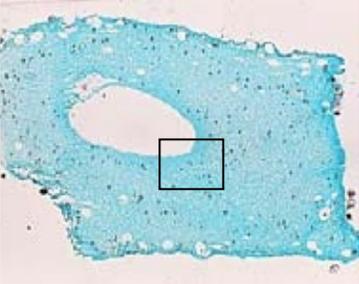
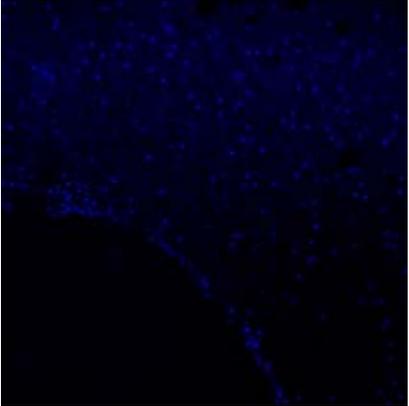
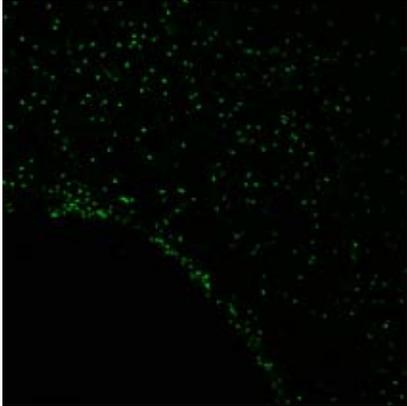
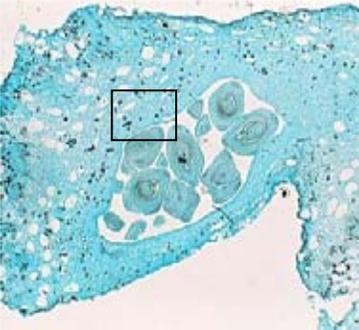
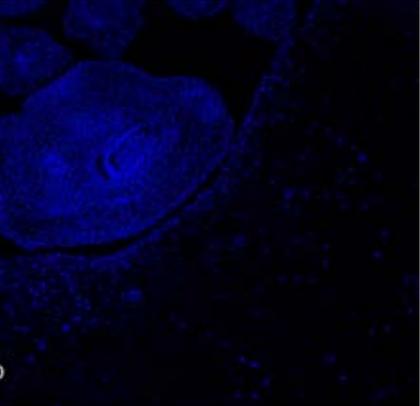
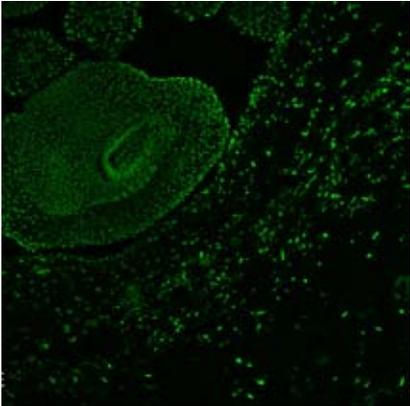
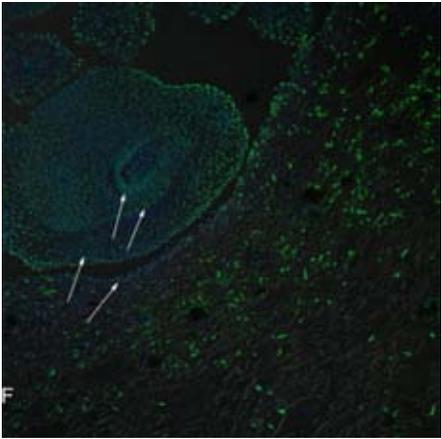
<b>OVARIO</b> <b>Flores Masculinas</b>	<b>Tinción de DAPI</b>	<b>Tinción de TUNEL</b>	<b>Imágenes superpuestas</b>
<b>Etapa 13</b> 			
<b>Etapa 13</b> 			

Figura 23. Ovarios y ovarios con óvulos de flores masculinas. El recuadro indica el sitio del ovario que se observa en las pruebas. En este tejido se observa en los núcleos la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

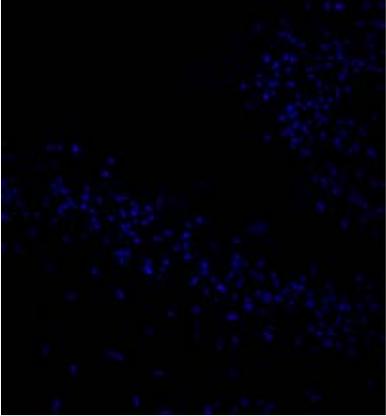
ESTIGMA Flores Femeninas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p data-bbox="142 402 254 435"><b>Etapa 4</b></p> 			

Figura 24. Estigma de flor femenina, el recuadro indica el sitio del estigma que se observa en las pruebas. En este tejido no se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes superpuestas no se observan núcleos con DNA fragmentado.

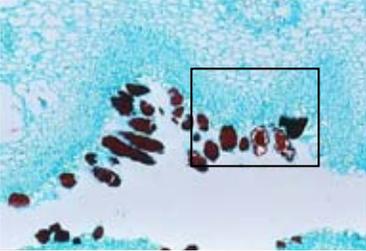
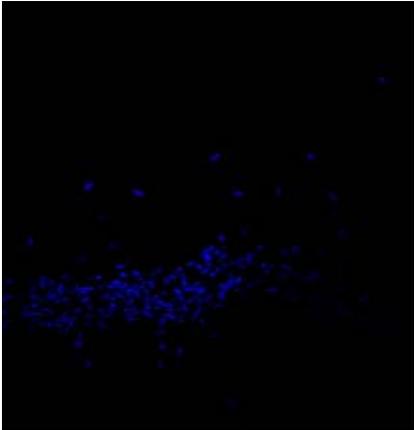
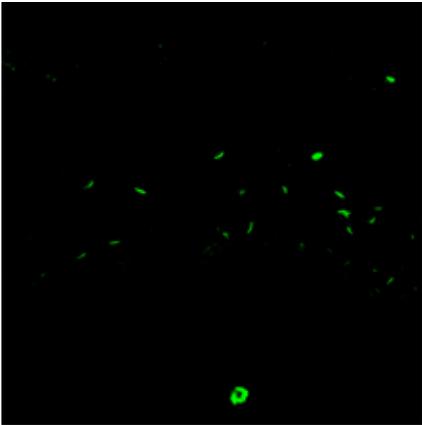
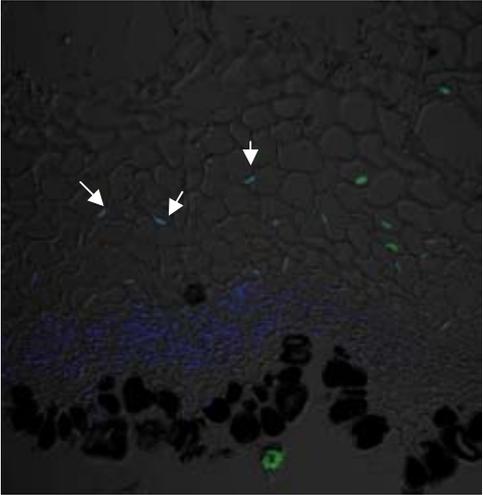
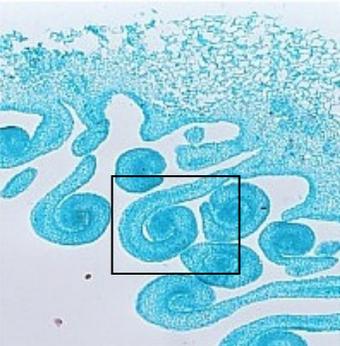
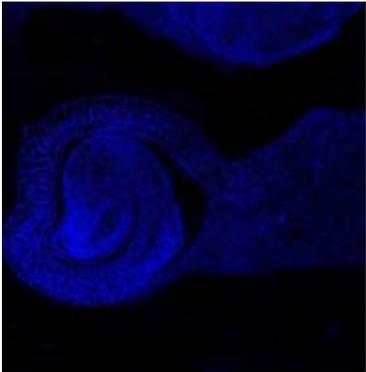
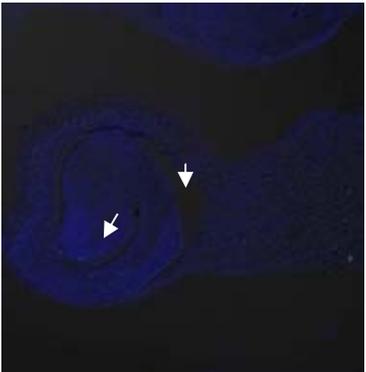
ESTILO Flores Femeninas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p data-bbox="142 402 256 435"><b>Etapa 4</b></p> 			

Figura 25. Estilo de flor femenina. El recuadro indica el sitio del estilo que se observa en las pruebas. En este tejido se observa en los núcleos del córtex la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido, en las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

<b>OVARIO Flores Femeninas</b>	<b>Tinción de DAPI</b>	<b>Tinción de TUNEL</b>	<b>Imágenes sobrelapadas</b>
<p data-bbox="268 483 386 521"><b>Etapa 6</b></p> 			

# DISCUSIÓN

En la familia Cactaceae, que cuenta con al menos 2000 especies (Anderson, 2001), se han observado y estudiado en 28 especies de nueve géneros sistemas reproductores diferentes al hermafrodita. Cabe destacar que pocos son los estudios que describen la etapa del desarrollo en el cual el crecimiento de uno de los verticilos sexuales se detiene, dando como resultado flores funcionalmente unisexuales, ya sean masculinas o femeninas (Flores, 2005; Strittmatter *et al.*, 2006; Sánchez, 2007).

De acuerdo a Orozco (2002) la unisexualidad en los miembros de la familia Cactaceae posiblemente ha surgido evolutivamente en múltiples ocasiones, teniendo diversos orígenes. Mitchell y Diggle (2005) mencionan que la presencia del dioicismo en diferentes familias de angiospermas puede considerarse como homoplasia, esto mismo sería lo que sucede dentro de la familia Cactaceae.

El dioicismo es un mecanismo que promueve la polinización cruzada entre los individuos, manteniendo la variación genética y ha evolucionado como una respuesta de selección para evitar la endogamia o como respuesta a factores ecológicos como polinización, distribución y restricción de recursos (Pannell, 2000). Del Castillo y González (1988) al describir las distintas poblaciones de *Opuntia robusta* con polimorfismo floral encontraron que el hermafroditismo predomina en sitios donde son menores las oportunidades de que un individuo deje descendencia a través de fecundación cruzada es decir, en condiciones de escasez de polinizadores o de plantas disponibles para intercambios genéticos. En las poblaciones estudiadas de *O. robusta* el dioicismo predomina en poblaciones centrales debido a que los individuos unisexuales tienen mayores tasas de crecimiento, sobrevivencia y son más resistentes a la herbivoría, por lo que al haber competencia intraspecífica en sitios densos, el dioicismo prevalecería sobre el hermafroditismo.

Respecto al modelo de evolución del dioicismo en *O. robusta*, hay diferencia en cuanto a la asignación de recursos en las flores unisexuales, encontrando que las plantas unisexuales son competitivamente superiores a los hermafroditas. Esta

ganancia de recursos se ve reflejada en el incremento en la cantidad y calidad de polen u óvulos que producen los individuos unisexuales con respecto a los hermafroditas, aumentando así la calidad de su descendencia, lo cual explica el establecimiento del dioicismo en esta población (Del Castillo ,1986).

En la familia Cactaceae, las especies que han sido reportadas con un sistema reproductivo diferente del hermafrodita han sido denominadas como funcionalmente dioicas debido a la presencia de ambos verticilos sexuales en las primeras etapas del desarrollo y la funcionalidad de sólo uno de ellos en las flores en anthesis. De acuerdo con Strittmatter *et al.* (2002) y Hoffman (1992) lo anterior sugiere que los ancestros de estas especies tenían un sistema reproductivo hermafrodita y que la ruta de evolución se llevó a cabo por esta vía. Para las especies ginodioicas como *Opuntia quimilo* Bawa (1980) sugiere que el ginodioicismo puede ser una condición estable o sólo una etapa en la evolución del dioicismo, mientras que para la especie trioica *Pachycereus pringlei*, Fleming *et al.* (1994) consideran que el trioicismo pudo haber resultado de la disminución del dioicismo y de la invasión de individuos hermafroditas en poblaciones con individuos masculinos y femeninos.

Respecto a la ruta de evolución del sistema reproductivo en *O. robusta* Del Castillo y González (1988) proponen a la heterostilia como precedente al dioicismo, en la que esta condición pudo haber favorecido a los individuos cuyo sexo está asociado con el tipo de estilo que les permitiera un funcionamiento más eficiente, así las plantas masculinas poseen un estilo largo y delgado para permitir mejor el acceso del polinizador y las femeninas poseen un estilo más pequeño con un estigma desarrollado que asegura la transferencia de polen cuando el polinizador alcanza la zona nectarífera.

Con el presente análisis embriológico realizado en *O. robusta* se considera que la interpretación de la heterostilia puede ser falsa, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos la diferencia entre la longitud de los estilos se debe a la atrofia de los tejidos que lleva a una reducción de éstos en las flores masculinas. Se observó que entre los dos tipos florales estudiados de existe un ligero dimorfismo en el gineceo, el cual se ve reflejado principalmente en la cantidad de papilas estigmáticas (menor en las flores masculinas) y en

el número de óvulos y tamaño del ovario (longitud de la cámara del ovario y grosor del pericarpelo), en la población estudiada se encontraron hasta 10 óvulos, lo cual difiere de lo reportado por Del Castillo (1986) quien menciona que puede haber hasta 40 óvulos en las flores masculinas; la diferencia puede deberse a variaciones morfológicas entre las poblaciones. Asimismo en las flores femeninas los estambres son mas pequeños y las anteras no producen polen, mientras que las flores masculinas producen una gran cantidad de granos de polen. A nivel del perianto el dimorfismo entre las flores masculinas y las femeninas no es muy marcado, pero se desconoce si existe algún efecto de la reducción de los órganos reproductores sobre los polinizadores.

El estigma de las flores masculinas se encuentra reducido en tamaño y número de lóbulos en comparación con el de las femeninas, en éstas los lóbulos estigmáticos son divergentes al igual que en las flores femeninas y/o hermafroditas de *Consolea spinossisima* (Strittmatter *et al.*, 2002) y *O. quimilo* (Díaz y Cocucci, 2003), lo cual se ha relacionado con asegurar la transferencia de polen al ser visitadas por los polinizadores (Del Castillo y González, 1988).

Un resultado interesante de esta investigación es que ambos morfos florales de *Opuntia robusta* presentan estilos huecos, en los estilos huecos se sabe que los tubos polínicos crecen a través de las células del canal estilar (células de la epidermis interna del carpelo) o bien sobre el propio canal estilar el cual está lleno de secreción, estas estructuras funcionan para que los tubos polínicos puedan crecer y nutrirse para alcanzar los óvulos, en *O. robusta* el canal estilar está formado por las células papiladas de la epidermis interna, éste carece de secreción por lo que no es como los estilos huecos típicos (Raghavan, 1997).

En las flores masculinas, los estilos están reducidos en comparación con el de las femeninas en diversas zonas. El tejido de transmisión es más reducido en las flores masculinas que en las femeninas, pero a pesar de esto llamó la atención que tanto el estigma y el tejido de transmisión en las flores masculinas son funcionales, ya que al realizar polinizaciones manuales y analizar estilos de flores post-antesis se detectaron tubos polínicos creciendo por estos tejidos, aunque el ovario carezca de óvulos maduros o

incluso de óvulos. Estos resultados sugieren que las células del canal estilar no son la zona por la cual crezcan los tubos polínicos, lo cual explica la falta de líquido secretado por éstas; esto mismo es observado por Strittmatter *et al.* (2002) para la especie *Consolea spinossisima* y quienes denominan a este tipo de estilo como semisólido.

En el presente trabajo se considera que *O. robusta* no presenta estilos huecos típicos, además no hay por el momento una explicación sobre la presencia y función de las células papilares, que no parecen ser secretoras, debido a que no se detectó ninguna secreción a lo largo del canal estilar relacionada con el crecimiento de los tubos polínicos. La presencia de taninos en el canal estilar pudiera estar relacionada con la herbivoría, ya que estos compuestos de acuerdo con Zucker (1983) tienen un papel como mecanismo de defensa contra la herbivoría y el parasitismo en las plantas, ya que afectan el sabor de los tejidos y los procesos digestivos de dichos animales, asimismo favorecen el retraso en la descomposición del tejido vegetal.

Probablemente las células papiladas de la epidermis interna del canal estilar son más grandes en la parte apical del estilo para formar una barrera de protección más eficiente contra los parásitos o herbívoros y asegurar el desarrollo de los óvulos, ya que de acuerdo a Shykoff *et al.* (1996) algunos patógenos usan el estigma y el canal estilar como punto de entrada a la flor.

A pesar de que el número de tubos polínicos que se observaron creciendo en el estilo de las flores funcionalmente masculinas fue menor al observado en las flores funcionalmente femeninas, esto contrasta con las observaciones para este morfo floral en otras especies de la subfamilia Opuntioideae, por ejemplo en *Opuntia stenopetala* que carece de estigma, el tejido de transmisión es sumamente reducido (Orozco, 2002, 2005) y no permite el crecimiento de tubos polínicos (G. Orozco, com. pers.) y en *Consolea spinossisima* en la que, al igual que en *O. robusta* y en *C. rubescens*, los lóbulos estigmáticos permanecen cerrados y si bien el polen germina en ellos, el estilo carece de los nutrimentos o señales químicas necesarios, evitando el crecimiento de los tubos polínicos (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000, Strittmatter *et al.*, 2002).

La presencia de gran cantidad de óvulos campilótrpos en diferentes etapas de desarrollo en los ovarios de las flores funcionalmente femeninas de *Opuntia robusta* coincide con lo reportado para este morfo floral en otras especies de la subfamilia Opuntioideae, tales como *Consolea spinossisima*, *O. stenopetala* y *O. quimilo*. En esta última las flores funcionalmente femeninas producen mayor cantidad de óvulos que las hermafroditas (Orozco, 2002, Strittmatter *et al.*, 2002, Díaz y Cocucci, 2003), en éstas posiblemente los óvulos no han desaparecido totalmente porque el periodo de tiempo evolutivo no ha sido suficiente para que esto ocurra, pero apoyan la hipótesis de que el ancestro debió ser hermafrodita.

Las flores funcionalmente masculinas de algunas especies unisexuales de la subfamilia Opuntioideae, como *Consolea spinossisima*, *C. corallicola*, *C. rubescens*, *C. millspaughii*, *C. moniliformis*, *C. nashii* y *C. picardeae* desarrollan numerosos óvulos, pero en etapa de antesis éstos se encuentran totalmente degenerados (Strittmatter *et al.*, 2002; Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004; Strittmatter *et al.*, 2006). En el caso de *Opuntia stenopetala* se observaron flores funcionalmente masculinas con óvulos o con primordios de óvulo de placentación basal, pero su desarrollo no se concluye o ni siquiera inician su desarrollo respectivamente (Orozco, 2002), lo que habla de que la especie se encuentra en una etapa evolutiva avanzada o sigue una estrategia de abortición temprana de los óvulos, comparada con las otras especies de cactáceas con ovarios no funcionales.

La mayoría de los ovarios de flores funcionalmente masculinas de *O. robusta* se encuentran vacíos, coincidiendo con la estrategia propuesta para *O. stenopetala* sin embargo, también hay individuos que presentan ovarios con óvulos en la base, los cuales no llegan a la etapa de madurez, esto a su vez concuerda con los reportes para algunas especies del género *Consolea*; puede darse el caso que los óvulos alcancen la madurez cuando el individuo se encuentra en etapa de antesis, pero no se desarrollarán semillas debido a que son abortados por un proceso de muerte celular programada como se explicará más adelante.

La mayoría de las especies dioicas descritas para la familia, empiezan su desarrollo como flores bisexuales, pero a lo largo del desarrollo uno de los verticilos sexuales se

atrofia; el androceo en las flores funcionalmente femeninas y el gineceo en las flores funcionalmente masculinas, resultando en la funcionalidad de sólo uno de ellos y en la presencia vestigial del otro. Esta condición se reporta para *Opuntia robusta* (Del Castillo, 1986), *Pereskia portulacifolia* (Leuenberger, 1986) *P. marcanoi* (Areces-Mallea, 1992), *Echinocereus coccineus* (Hoffman, 1992), *Pachycereus pringlei* (Fleming et al., 1994), *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Valiente-Banuet et al., 1997), *O. sanfelipensis* (Rebman, 1998), *Consolea rubescens* (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000), *O. quitensis* (Anderson, 2001), *O. stenopetala* (Orozco, 2002), *C. spinosissima* (Strittmatter et al., 2002), *O. quimilo* (Díaz y Cocucci 2003), *C. corallicola* (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2004), *E. yavapaiensis* (Baker 2006), *C. millspaughii*, *C. moniliformis*, *C. nashii* y *C. picardeae* (Strittmatter, et al, 2006) y *Mamillaria dioica* (Sánchez, 2007).

Estas especies, de acuerdo a la clasificación de las flores propuesta por Mitchell y Diggle (2005), pueden ser clasificadas como flores unisexuales de tipo I, en las que la unisexualidad es derivada de la aborción de uno de los verticilos sexuales. Esto contrasta con las flores de tipo II en donde el meristemo floral desarrolla únicamente al gineceo o al androceo, dicha condición en la familia Cactaceae se reporta únicamente para la especie *Selenicereus innesii* que presenta flores pistiladas sin anteras pero no hay evidencias que lo corroboren (Kimnach, 1982). Para Parfitt (1985) *S. innesii* debe considerarse como funcionalmente hermafrodita debido a que sus semillas y frutos son desconocidos y las flores pistiladas presentan malformaciones en el gineceo.

El hecho de que al inicio del desarrollo las flores sean bisexuales y después por atrofia se vuelvan funcionalmente unisexuales, puede ser interpretado por la teoría de Ashman (2000) y la hipótesis de limitación de polinizadores de Charlesworth (1993). Estos autores señalan que las flores funcionalmente femeninas de una población determinada conservan las estructuras masculinas para evitar selectividad de polinizadores, es decir, que algún tipo floral deje de ser visitado por ellos. Hoffman (1992) recalca que esto sucede en las poblaciones dioicas de *Echinocereus coccineus* en las que ambos morfos florales son visitados por las mismas especies de abejas, debido a que las flores funcionalmente femeninas aparentan ser masculinas, pero no ofrecen la recompensa de polen.

Para algunas especies de cactáceas el tipo de polinizador cambia de acuerdo al sistema reproductivo, como sucede, en las poblaciones trioicas de *Pachycereus pringlei* donde la polinización es llevada a cabo principalmente por murciélagos y mientras que en las ginodioicas es realizada por aves e insectos (Fleming *et al.*, 1998). En poblaciones ginodioicas de *Opuntia quimilo*, Díaz y Cocucci (2003) reportan diferencias en la frecuencia de polinización entre los morfos florales, las flores hermafroditas son visitadas principalmente por abejas y las femeninas por colibríes. De igual forma en dos poblaciones de *Echinocereus coccineus* las poblaciones hermafroditas son polinizadas principalmente por colibríes y las dioicas se encuentran en áreas donde abundan las abejas, mismas que las polinizan y los colibríes están ausentes (Scobell y Schultz 2005). Las diferencias en la polinización en estos dos últimos casos están relacionadas, según los autores, con la alta tasa de entrecruzamiento que producen los colibríes, ya sea para favorecer el éxito reproductivo de las flores femeninas o para mantener las poblaciones hermafroditas, respectivamente.

Del Castillo y González (1988) reportan que los principales polinizadores de *O. robusta* son abejas de tamaño mediano (14 mm) las cuales muestran el mismo comportamiento en los tres morfos florales, es decir que los cambios observados en la morfología floral no parecen ser suficientes para limitar totalmente el acceso de un tipo de polinizador y favorecer a otro. Valiente-Banuet *et al.* (1997) reportan para una población androdioica de *Neobuxbaumia mezcalaensis* que la polinización es principalmente por murciélagos y no mencionan que el polinizador muestre preferencia por algún tipo floral debido probablemente a que en una población androdioica todas las flores ofrecen la recompensa de polen.

Es necesario diferenciar entre los términos: muerte celular programada y senescencia, la primera se refiere a la muerte de tipos celulares individuales y la segunda se refiere a degeneración de órganos completos, estos dos procesos son parte del desarrollo normal en las plantas (Rogers, 2006).

Los tejidos que presentan muerte celular programada muestran algunos de los cambios estructurales característicos de la apoptosis. Estos cambios citológicos incluyen,

condensación nuclear, contracción celular y principalmente fragmentación del DNA (Nooden, 2004). Se ha reportado que la muerte celular programada ocurre en etapas jóvenes del desarrollo sexual y se refleja en la aborción selectiva de los primordios de uno u otro órgano sexual, en plantas con flores unisexuales y durante el desarrollo de los órganos reproductivos y gametos, tanto femeninos como masculinos (Calderón-Urrea y Dellaporta, 1999; Wu y Cheung, 2000; Caporali *et al.*, 2003).

Caporali *et al.* (2003) reportan para las flores unisexuales de una variedad silvestre de *Vitis vinifera* L., que la aborción del pistilo en las flores masculinas comienza con la no diferenciación del estilo y el estigma, el crecimiento del ovario se detiene, pero el desarrollo de óvulos continúa, después por un proceso de muerte celular programada de las células externas de la nucela y algunas capas de las células tegumentarias el desarrollo de los óvulos se detiene.

En las cactáceas se ha reportado muerte celular programada en anteras de flores funcionalmente femeninas las cuales abortan en diferentes etapas del desarrollo según la especie (Flores, 2005; Strittmatter *et al.* 2006; Silva *et al.* 2007). En cuanto a la parte femenina actualmente se está analizando las etapas críticas en las cuales se lleva a cabo la aborción de alguna estructura del gineceo en *Opuntia stenopetala* (Vázquez-Santana, 2007)

De acuerdo con los resultados obtenidos con la prueba de TUNEL las evidencias de muerte celular programada no están presentes en las células del estigma ni del tejido de transmisión en el estilo, esto corresponde con lo esperado al observar la germinación de los tubos polínicos a través de este último, en el estilo de las flores tanto masculinas como femeninas se observó fragmentación nuclear en las células del córtex, las cuales forman las células de mucílago conforme avanza el desarrollo, lo que indica que la formación de canales de mucílago se lleva a cabo por un proceso de muerte celular programada.

En ovarios, y en su caso en óvulos de las flores masculinas, se observó la presencia de DNA fragmentado en la pared interna del ovario, la placenta, funículos y tejido nucelar de los óvulos, esto sugiere que el proceso de muerte celular programada está involucrado

con la no funcionalidad del gineceo en estas flores y podría explicar el tamaño reducido de la cavidad ovárica, la no formación de óvulos y el desarrollo incompleto de éstos. La muerte celular programada está actuando como un mecanismo que lleva a la atrofia de los órganos sexuales en algunas de las especies de Cactaceas con flores unisexuales.

# CONCLUSIONES

La condición sexual en la familia Cactaceae es generalmente hermafrodita, sin embargo por la muerte celular programada que lleva a la atrofia de alguno de los verticilos sexuales las flores resultan ser unisexuales en la madurez.

Existe un ligero dimorfismo entre el gineceo y otras estructuras de las flores funcionalmente estaminadas y funcionalmente pistiladas de *Opuntia robusta*, sin embargo los dos tipos mantienen ambas estructuras sexuales, posiblemente las flores funcionalmente femeninas mantienen las estructuras masculinas para evitar ser excluidas por los polinizadores o bien porque no ha transcurrido el tiempo evolutivo suficiente para eliminarlas.

Las evidencias que sugieren que la condición ancestral de *O. robusta* fue el hermafroditismo son:

- 1) Presencia en una flor de ambos órganos sexuales, (androceo y gineceo) uno de ellos vestigial o poco desarrollado.
- 2) Estigma y estilo reducidos pero funcionales en las flores funcionalmente masculinas.
- 3) Ausencia o rara vez Presencia de un numero reducido de óvulos en las flores funcionalmente masculinas no desarrollados o bien abortados en la madurez.

Los estigmas y estilos de las flores funcionalmente masculinas de *O. robusta* se encuentran reducidos en comparación con los de las flores femeninas, pero son funcionales al permitir la germinación de los granos de polen y el crecimiento de tubos polínicos, aunque no hay óvulos fértiles, ni se ha detectado presencia de semillas en plantas masculinas.

En ambos morfos florales, ni el canal estilar ni la epidermis interna del canal favorecen el crecimiento de los tubos polínicos, éstos crecieron sólo en el tejido de transmisión adyacente al canal estilar, y en menor proporción en los estilos reducidos de las flores masculinas.

En ciertas ocasiones se observó que las plantas masculinas pueden desarrollar flores funcionalmente masculinas con algunos óvulos que llegan a desarrollarse, pero en la antesis mueren.

En las flores funcionalmente masculinas de *Opuntia robusta* se observó el DNA fragmentado en dos tipos celulares, el primero, en el ovario y óvulos indicando la posibilidad de que la muerte celular programada esté implicada en la disfuncionalidad del verticilo femenino en dichas flores como en otras cactáceas con flores unisexuales; el segundo, en las células del córtex, lo que indica que la formación de canales de mucílago se lleva a cabo por un proceso de muerte celular programada.

## LITERATURA CONSULTADA

- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. *Annals of Botany* **86**: 211-221.
- Anderson, E. F. 2001. The cactus family. Timber Press. E. U. A. 776 pp.
- Anderson G., B. López., T. Stuessy y D. Crawford. 2000. Dioecy and pollination in *Pernettya rigida* (Ericaceae) of the Juan Fernandez Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society* **132**: 121-141.
- Areces-Mallea, A. E. 1992. *Pereskia marcanoii* a new species of Cactaceae from Hispaniola. *Brittonia* **44**(4): 423-428.
- Ashman, T.L. 2000. Pollinator Selectivity and Its Implications for the Evolution of Dioecy and Sexual Dimorphism. *Ecology* **81**(9): 2577-2591.
- Baker, H.G. 1984. Some Functions of Dioecy in Seed Plants. *The American Naturalist* **124** (2): 149-158.
- Baker, M. 2006. A new florally dimorphic hexaploid, *Echinocereus yavapaiensis* sp. nov. (section *Triglochidiatus*, Cactaceae) from central Arizona. *Plant Systematics and Evolution* **258**: 63–83.
- Balk J., C.J. Leaver y P. F. McCabe. 1999. Translocation of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Letters* **463**(1-2): 151-154.
- Barret, S. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* **3**(9):335-341.
- Barret, S. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature* **3**:274-284.
- Bawa, K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**: 15-39.
- Bawa, K.S. 1984. The Evolution of Dioecy-Concluding Remarks. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **71** (1): 294-296.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. 1. UNAM. México. 743 pp.
- Calderón-Urrea, A. y S.L. Dellaporta. 1999. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* **129**: 435-441.
- Caporali, E., A. Spada, G. Marziani, O. Failla y A. Scienza. 2003. The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* spp *silvestris*. *Sexual Plant Reproduction* **15**(6): 291-300.

- Charlesworth, D. 1993. Why are unisexual flowers associated with wind pollination and unspecialized pollinators?. *The American Naturalist* **141**( 3): 481-490.
- Del Castillo, R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 133 pp.
- Del Castillo, R. 1995. Ensayo sobre el fenómeno calcícola-calcífuga en cactáceas mexicanas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **41**: 3-12
- Del Castillo, R y M. González. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* **71**: 185-196.
- Dellaporta, S.L. y A. Calderón-Urrea. 1994. The sex determination process in maize. *Science* **266**: 1501-1505.
- Díaz L. y A. Cocucci. 2003. Functional gynodioecy in *Opuntia quimilo* (Cactaceae), a tree cactus pollinated by bees and hummingbirds. *Plant Biology* **5**:531-539.
- Fleming, T., S. Maurice., S. Buchman y M. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* **81**: 858-867.
- Fleming, T., S. Maurice y J. Hamrick. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* **12**: 279-289.
- Flores, L. 2005. Esterilidad masculina de *Opuntia stenopetala*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 87 pp.
- Greenberg, J.T. 1996. Programmed cell death: A way of life for Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12094-1209.
- Hoffman, T. M. 1992. Funcional Dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): Breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany* **12**: 1382-1388.
- Jiang, X. y X. Wang. 2004. Cytochrome *c*-mediated apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* **73**: 87-106.
- Jiménez, K. 2002. Embriología de *Pereskia lychnidiflora*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 65 pp.
- Kimnach, M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)* **54**: 3-7.

- Lebel-Hardenack, S. y S. Grant. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science* **2**: 130-136.
- Lemus-Jiménez, L.J. y N. Ramírez. 2005. Sistemas reproductivos de las plantas en tres hábitats de la planicie costera de Paraguaná, Venezuela. *Revista de Biología tropical* **53** (3-4): 415-430.
- Leuenberger B.E. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). Memoirs of the New York Botanical Garden. Vol. 41. The New York Botanical Garden. E.U. A 133 pp.
- Lindsay G. y E. Dawson. 1952. *Mammillaria* of the islands off Northwestern Baja California, México. *Cactus and Succulent Journal* **24**: 76-84.
- Liu, X.S., C. N., Kim, J. Yang, R. Jemmerson y X.D. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**: 147–157.
- López, C.M., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en Angiospermas. Las Prensas de Ciencias. UNAM. México D.F. 178 pp.
- Mitchell, C. H. y P. K. Diggle. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *American Journal of Botany* **92**(7): 1068–1076.
- Negrón-Ortiz, V. y L. Strittmatter. 2004. Embryology of floral dimorphism and gender system of *Consolea corallicola* (Cactaceae), a rare species of the Florida Keys. *Haseltonia* **10**: 1-10.
- Nooden L. 2004. Plant cell death processes. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 392 pp.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala*. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 82 pp.
- Orozco, G. 2005. Clonación de TSL y STY en *Opuntia stenopetala*. Dos genes asociados al desarrollo del estilo y el estigma. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 87pp.
- Pannell, J. 2000. Review: Gender and Sexual Dimorphism. *New Phytologist* **145** (3): 423-425.
- Parfitt, B. 1985. Dioecy in North American Cactaceae: a Review. *SIDA* **11**: 200-206.
- Raghavan, V. 1997. Molecular Embryology of Flowering Plants. Cambridge University Press. E.U. A 712 pp.
- Rebman, J. 1998. A new cholla (Cactaceae) from Baja California , Mexico. *Haseltonia* **6**: 17-21.

- Rebman, J y D. Pinkava, 2001. *Opuntia* cacti of North America- An overview. *Florida entomologist* **84**(4): 474-483.
- Renner, S. y R. Ricklefs. 1995. Dioecy and Its Correlates in the Flowering Plants. *American Journal of Botany* **5**: 596-606.
- Reyes-Argüero, J.A., J.R. Aguirre y A. Valiente-Banuet. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments* **64**(4): 549-585.
- Roche. 2002. In situ cell death Detection Kit, AP. Instruction Manual. Alemania. 23 pp.
- Rogers, H. 2006. Programmed Cell Death in Floral Organs: How and Why do Flowers Die?. *Annals of Botany* **97**: 309–315
- Sánchez, D. 2007. Embriología de *Mammillaria dioica* K. Brandegees (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 52 pp.
- Scobell, S. y S. Schultz. 2005. GIS and Path Analysis: Examining Associations Between the Birds, the Bees, and Plant Sex in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae). *Forest Service Proceedings* **36**: 438-443.
- Shykoff, J., E. Bucheli, O. Kaltz. 1996. Flower lifespan and disease risk. *Nature* **379**: 779–780.
- Shimizu, S., M. Narita y Y. Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483–487.
- Silva, J. A. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 61 pp.
- Silva, J., R. Hernández, I. Alfaro, J. Márquez y S. Vázquez. 2007. Desarrollo de flores unisexuales de *Opuntia robusta* (CACTACEAE). En libro de resúmenes XVII Congreso Mexicano de Botánica, del 14 al 18 de octubre 2007, Zacatecas, Zacatecas. México.
- Strittmatter, L. I., y V. Negrón-Ortiz. 2000. Floral dimorphism in two species of *Consolea* (Cactaceae): implications for mating system and taxonomy. En libro de resúmenes de Symposium 2000. The flora of the Greater Antilles. p.47.
- Strittmatter, L. I., V. Negrón-Ortiz y J. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* **89**: 1373-1387.
- Strittmatter, L. I., V. Negrón-Ortiz y J. Hickey. 2006. Comparative microsporangium development in male-fertile and male-sterile flowers of *Consolea* (Cactaceae): When and how does pollen abortion occur. *Grana* **45**(2): 81 - 100
- Valiente-Banuet, A., A. Rojas y L. Aarsen. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* y *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *American Journal of Botany* **84**: 452-455.

- Vamosi, J.C. y S.P. Otto. 2002. When Looks Can Kill: The Evolution of Sexually Dimorphic Floral Display and the Extinction of Dioecious Plants. *Proceedings: Biological Sciences* **269** (1496): 1187-1194.
- Vázquez-Santana, S., G. Orozco-Arroyo, L. Flores-Rentería, O. Montero-Alfaro, I. Alfaro-Pereira, J. Márquez-Guzmán y F. Cruz-García. 2007. Carpel development genes and dioecy in the cactus *Opuntia stenopetala*. En Libro de resúmenes Plant Biology and Botany 2007 Congress, del 7 al 11 de Julio 2007, Chicago, Illinois. EUA. p: 173.
- Vianello, A. M. Zancani, C. Peresson, E. Petrusa, V. Casolo, J. Krajnáková, S. Patui, E. Braidot y F. Macrí. 2007. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiologia Plantarum* **129**: 242–252.
- Wu, H., y Y. Cheung. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* **44**: 267-281.
- Zucker, W. 1983. Tannins: Does Structure Determine Function? An Ecological Perspective. *The American Naturalist* **121**( 3): 335-365.
- Zhao, Y., Z.F. Jiang, Y.L. Sun y Z.H. Zhai.1999. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters* **448**: 197–200.