



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Estudio comparativo de la sexualidad floral de  
*Echinocereus coccineus* y *Echinocereus polyacanthus*  
(Cactoideae: Cactaceae).

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ROCÍO HERNÁNDEZ CRUZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

COMITÉ TUTOR: DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES  
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

OFICIO FCIE/DEP/602/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **5 de septiembre de 2011** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **HERNÁNDEZ CRUZ ROCÍO** con número de cuenta **301025539** con la tesis titulada "**Estudio comparativo de la sexualidad floral de *Echinocereus coccineus* y *Echinocereus polyacanthus* (Cactoideae:Cactaceae)**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**:

Presidente: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN  
Vocal: DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES  
Secretario: DRA. FLORENCIA TIBERIA AUCÁN GARCÍA CAMPUSANO  
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

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

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de octubre de 2011

*M. del Coro Arizmendi*

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **AGRADECIMIENTOS**

- Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por la beca otorgada para la realización de este proyecto. A los Proyectos de Investigación DGAPA PAPIIT-IN 226808 y CONACYT 101771, por su apoyo y patrocinio para la realización de esta tesis.
- A los miembros del Comité Tutor: Dra. Sonia Vázquez Santana, Dr. Salvador Arias Montes y Dr. Luis Felipe Jiménez. Por su apoyo académico y personal, por sus valiosas observaciones y por aportar información clave para este proyecto.

## **AGRADEZCO A:**

La Universidad Nacional Autónoma de México.

Dios y a la vida por todo.

Mis papás, por su apoyo y cariño en esta etapa de mi vida tanto académica como personal.

Mi hermana Ary por su apoyo infinito, las pláticas, las risas, los abrazos y los bebecitos. Te amo hermana.

Marco por ser el hombre de mi vida, por tus enseñanzas, tu comprensión, tu amor y todo lo que no puedo escribir aquí porque para expresar mi agradecimiento y mi amor por tí se requieren varias bitácoras.

Mi amiga Dany, por su apoyo y ayuda en estos años, porque sé que siempre estás ahí.

Mis tíos Angélica, Carmina y Carlos por su apoyo, cariño y por tener fé en mí.

Mi querida asesora Sony, por su apoyo y conocimiento a lo largo de esta investigación

Mis amigas de toda la carrera: Claudia, Tania y Zen por su valiosa amistad, por las pláticas, los secretos, el café, las vacaciones, las fiestas, las competencias, por tantos momentos inolvidables y los que faltan. Muchas gracias muchachas!

Mis amigos Chepe, Luis, Miguel y Romano por su ayuda y apoyo, sus pláticas, las reuniones y el cariño a lo largo de estos años.

Alde por su apoyo, sus consejos, su paciencia y ayuda en este trabajo.

Melb por su buena vibra, sus pláticas y los buenos momentos

Mis amigos y compañeros del laboratorio (maratón): Alfred, Almita, Diana, Eli, Isa, Magali, Moni, Saúl y Uli por su apoyo, sus pláticas en vivo y en FB, la hora de la comida, las tardeadas y porque han hecho de esta una de las mejores etapas.

Las maestras Mague, Clarita, Paty y Kary por las enseñanzas, las pláticas, su ayuda y por compartirme su conocimiento.

Mary Kay, Patty González y a la unidad Lucero por creer en mí y siempre arrancarme una sonrisa.

Gracias a todas las personas que hicieron posible que llegara a esta meta y que estuvieron presentes a lo largo de este trabajo.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIALES**

Al Dr. Salvador Arias y al Dr. Luis Felipe Jiménez, por sus valiosas aportaciones durante los tutorales.

A la Dra. Judith Márquez, la Dra. Florencia García y al Dr. Víctor Chávez por sus valiosos comentarios y apoyo en la revisión de este trabajo.

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

A la M. en C. Karina Jiménez Durán por la toma de fotografías y las imágenes de microscopía confocal.

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

Al M. En C. Ricardo Wong por su asesoría durante todo el trabajo de Laboratorio

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

Al Dr. Daniel Sánchez por su apoyo en el trabajo de campo.

Al P. de Biól. Marco Antonio Tapia por su apoyo en el trabajo de campo, en el laboratorio y en el trabajo estadístico.

## **DEDICATORIA**

*A Marco Antonio por su apoyo y amor ABSOLUTOS.*

*A Diego Israel por ser el niño más increíble del mundo y porque sé que llegarás lejos.*

*A Karol Danae por demostrarnos que la fuerza también viene en envase pequeño.*

*A mis padres y hermana, por sus enseñanzas, amor, apoyo y momentos.*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
ANTECEDENTES.....	14
El género <i>Echinocereus</i> .....	14
<i>Echinocereus coccineus</i> .....	14
<i>Echinocereus polyacanthus</i> .....	14
Sistemas reproductores en angiospermas .....	15
Sistemas reproductores en la familia Cactaceae .....	15
Subfamilia <i>Pereskioideae</i> .....	16
Subfamilia <i>Opuntioideae</i> .....	17
Subfamilia <i>Cactoideae</i> .....	19
Evidencia de muerte celular programada en flores unisexuales .....	21
HIPÓTESIS .....	24
OBJETIVOS .....	24
Objetivo general .....	24
Objetivos particulares .....	24
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
Colecta y fijación.....	24
Inclusión y cortes histológicos .....	25
Observación al microscopio electrónico de barrido .....	26
Análisis cuantitativo de caracteres .....	26
Observación de tubos polínicos .....	26
Prueba de TUNEL.....	27
RESULTADOS.....	28
DESARROLLO .....	28
<i>Echinocereus coccineus</i> .....	28
<i>Echinocereus polyacanthus</i> .....	37
TRAYECTORIA Y CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS POR EL PISTILO .....	47
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CARACTERES .....	50
<i>Echinocereus coccineus</i> .....	50
<i>Echinocereus polyacanthus</i> .....	50
DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA .....	52
Controles de la prueba de TUNEL.....	52



<i>Echinocereus coccineus</i> .....	52
<i>Echinocereus polyacanthus</i> .....	53
DISCUSIÓN .....	66
CONCLUSIONES .....	74
PERSPECTIVAS .....	75
LITERATURA CITADA .....	76

## RESUMEN

El sistema reproductor en la familia Cactaceae se reporta generalmente como hermafrodita, es decir, que las flores presentan el verticilo sexual masculino (anteras) y femenino (gineceo), sin embargo, por atrofia de alguno de ellos, las flores pueden ser funcionalmente unisexuales. Las especies *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* son cactáceas filogenéticamente relacionadas que se distribuyen en los matorrales del norte de México, presentan tallos pequeños, solitarios o ramificados, con flores tubulares en tonos rosa, naranjas y rojas. En las poblaciones de estas especies se observan dos tipos de individuos, uno con flores estaminadas y otro con flores pistiladas.

El objetivo de esta investigación fue determinar el sistema reproductor de una población de *E. coccineus* y una población de *E. polyacanthus* comparando los procesos estructurales del desarrollo del gineceo y el androceo entre flores masculinas y femeninas. Se probó la funcionalidad del pistilo y la viabilidad de los granos de polen en los diversos morfos florales para determinar los tejidos involucrados en la aborción de alguno de los verticilos sexuales que conllevan al establecimiento de la unisexualidad en estas especies.

Para ambas especies se estableció la presencia de dos morfos florales:

Flores funcionalmente femeninas: poseen androceo estéril. El desarrollo del grano de polen se detiene en etapa pre-meiótica, las células del tapete se observaron atrofiadas debido a un proceso de muerte celular programada, por lo que las células madres de las microsporas no continuaron su desarrollo, no se forman granos de polen y finalmente las capas de la antera se colapsan completamente. El gineceo tiene estigma, estilo y ovario con muchos óvulos. Las polinizaciones tanto naturales como manuales promovieron la formación de semillas.

Flores funcionalmente masculinas: poseen el androceo bien desarrollado. Las anteras de estas flores producen una gran cantidad de granos de polen, en estas anteras sólo desaparecen la capa media y el tapete, pero esto sucede como un proceso normal de desarrollo. El gineceo está normalmente desarrollado, estigma, estilo, numerosos óvulos maduros. Sin embargo, al realizar polinizaciones cruzadas manuales, se observó que estas flores no produjeron frutos.

De acuerdo con estos resultados, se determinó que el sistema reproductor de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* es funcionalmente dioico, ya que si bien ambas flores mantienen las estructuras del sexo opuesto, éstas no son funcionales.

## ABSTRACT

The reproductive system in the Cactaceae family, are usually reported as a hermaphrodite, meaning that the flowers have both sexual whorls, male (anthers) and female (gynoecium); however, the atrophy of one of them, may produce functionally unisexual flowers. *Echinocereus coccineus* and *E. polyacanthus* are phylogenetically related cacti distributed in the bush of northern Mexico, have small stalks, solitary or branched, tubular flowers in shades of pink, orange and red. These species form two types of individuals, one bearing staminate flowers while the other produces pistillate flowers.

The objective of this research was to determine the reproductive system of a population of *E. coccineus* and a population of *E. polyacanthus*, comparing the structural processes of development of the gynoecium and androecium between the male and female flowers. We tested the functionality of the pistil and the viability of the pollen grains in the various floral morphs to determine the tissues involved in abortion of either of the sexual whorls that lead to the establishment of the unisexuality in these species.

For both species the presence of two floral morphs was established:

Functionally female flowers: they have sterile androecium. Pollen grain development stops at the pre-meiotic stage, tapetal cells become atrophied due to a process of programmed cell death, so the microspore mother cells do not continue their development, no pollen grains are formed and finally the layers of the anther collapse completely. The gynoecium has a stigma, style and ovary with many ovules. Natural and hand pollinations promoted the formation of seeds.

Functionally male flowers: they have a well-developed androecium that produces a large amount of pollen grains. In these anthers only the middle layer and the tapetum disappear, but this happens as a normal process of development. The gynoecium is normally developed, with stigma, style and an ovary with many mature ovules. However, when performing manual cross pollinations, it was observed that these flowers do not produced fruit.

According to these results, we found that the reproductive system of *E. coccineus* and *E. polyacanthus* is functionally dioecious, because although both flowers maintain the structures of the opposite sex, they are not functional.

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas reproductores se definen como: La forma en la cual se encuentran representados tanto espacial y temporalmente las estructuras reproductoras (androceo y gineceo) en los individuos de una población (Wyatt, 1983).

El hermafroditismo (flores con androceo y gineceo), el monoicismo (flores pistiladas y estaminadas en la misma planta) y el dioicismo son los principales sistemas reproductores que se presentan en las Angiospermas. El dioicismo consiste en la separación espacial de los sexos, mediante la presencia de individuos femeninos (con flores pistiladas) y masculinos (con flores estaminadas), esto ha sido observado entre familias de Angiospermas basales y derivadas (Ainsworth, 2000, Strittmatter, 2006).

La familia Cactaceae es endémica de América y cuenta con cerca de 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 pueden ser funcionalmente unisexuales. En Cactaceae se han reportado 24 especies de ocho géneros con sistemas reproductores diferentes al hermafrodita (Orozco, 2002; Sánchez, 2007; Silva, 2007).

La mayoría de las especies dioicas descritas para la familia, así como en otras angiospermas (Greenberg, 1996), 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 (Ainswoth, 2000). Lebel-Hardenack y Grant (1997) aseguran que las flores de la mayoría de las especies monoicas y dioicas durante las primeras etapas de desarrollo no pueden distinguirse de las flores hermafroditas 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, en diferentes etapas del desarrollo dependiendo de cada especie. En estudios previos para algunas especies de Cactaceae se ha detectado que puede variar la etapa del desarrollo en la cual se detiene el crecimiento de alguno de los órganos sexuales (Orozco, 2002; Sánchez, 2007; Silva, 2007, Hernández, 2008, Camacho, 2009).

Hoffman (1992) reporta poblaciones dioicas de *Echinocereus coccineus* Engelm., en las cuales las flores masculinas son de mayor tamaño que las femeninas, mencionando que hay diferencias en las dimensiones del androceo entre los dos morfos. Encontró en las flores

masculinas estambres 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.

Anderson (2001) reporta que las plantas de *Echinocereus polyacanthus* son solitarias o ramificadas, con flores tubulares de color rosa, naranjas a rojas y no menciona la presencia de flores unisexuales. Sin embargo Sánchez (2010) reporta la presencia de flores unisexuales y hermafroditas en poblaciones de esta especie, y que este carácter apoya la hermandad entre *E. coccineus*, *E. polyacanthus* y *E. yavapaiensis* por compartir un sistema de reproducción sexual ginodioico.

Recientemente se ha considerado a la muerte celular programada (MCP) como un evento que provoca la aborción de alguno de los órganos reproductores en flores funcionalmente unisexuales. (Greenberg, 1996) En la familia Cactaceae este hecho ha sido corroborado en *Opuntia stenopetala* (Flores, 2005; Alfaro, 2008), *Consolea spinosissima*, *C. millspaughii*, *C. moniliformis*, *C. nashii*, *C. picardeae*, *C. rubescens* (Strittmatter et al., 2006) *Opuntia robusta* (Alfaro, 2008; Hernández 2008) y *Pereskia portulacifolia* (Camacho, 2009).

La MCP es un proceso que forma parte del desarrollo normal de las plantas, desde la embriogénesis hasta la fertilización (Wu & Cheung, 2000). En la MCP las células vegetales muestran algunos cambios citológicos y bioquímicos que incluyen condensación nuclear, agregación de cromatina en los márgenes nucleares, migración de fosfaditil serina a la superficie externa de la membrana plasmática, contracción celular y fragmentación del DNA (Nooden, 2004). Este último proceso se considera como un indicador de MCP y 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 que están unidos a un fluorocromo. La enzima responsable de unir estos nucleótidos a los extremos 3'OH libres del DNA es la TdT (Terminal deoxinucleotidil-transferasa), de esta manera, mediante la excitación del fluorocromo (FITC) y detección de fluorescencia en verde, se hace evidente la fragmentación del DNA en multímeros de oligonucleosomas durante la muerte celular (Roche, 2002).

Debido a que los sistemas de reproducción sexual que contengan flores unisexuales (dioicos, ginodioicos, androdioicos y trioicos) son poco comunes dentro de la familia Cactaceae y por lo tanto poco conocidos en su origen, se necesitan estudios embriológicos detallados que

describan el desarrollo de las estructuras florales y que ayuden a determinar la funcionalidad de los verticilos sexuales, y de esta manera esclarecer el sistema reproductor en las plantas.

*Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* han sido reportadas como especies que presentan sistemas reproductores diferentes al hermafrodita. Dado que no se ha esclarecido el sistema reproductor de estas especies y se han reportado como funcionalmente dioicas y ginodioicas, aun faltan las evidencias embriológicas y fisiológicas suficientes para determinarlo.

Estas especies inician su desarrollo como bisexuales, sin embargo se desconoce el momento del desarrollo en el cual, el crecimiento de uno de los verticilos sexuales se detiene, asimismo no se conocen los mecanismos involucrados en el establecimiento de la unisexualidad.

En esta investigación se determinó el sistema reproductor de poblaciones de las especies *E. coccineus* y *E. polyacanthus* comparando el desarrollo del gineceo y el androceo entre flores masculinas y femeninas de las dos especies, probando la funcionalidad del pistilo, la formación del fruto y la viabilidad de los granos de polen en los diversos morfos florales.

## ANTECEDENTES

### El género *Echinocereus*

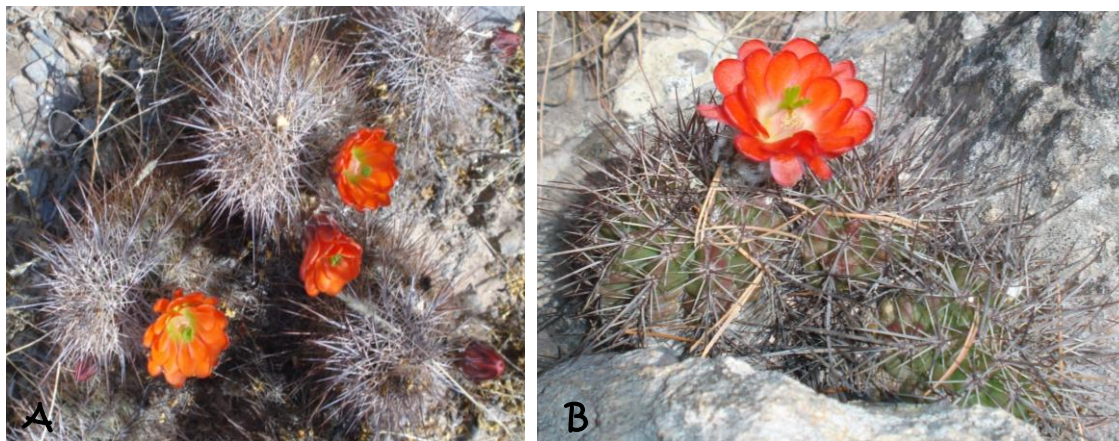
El género *Echinocereus* comprende más de 40 especies. Los individuos generalmente son de lento crecimiento con tallos suculentos, cilíndricos y con numerosas espinas. Poseen flores coloridas, infundibuliformes, con numerosos tépalos, estambres y frutos carnosos. Las flores permanecen abiertas por varios días. Las especies del género se distribuyen en las zonas más cálidas del occidente de Estados Unidos y en norte de México (Hoffman, 1992).

### *Echinocereus coccineus*.

Los individuos de esta especie generalmente poseen tallos agrupados, formando cúmulos de hasta 100, los cuales pueden o no presentar ramas cortas de 4-10cm, poseen de 5-14 costillas, de 0-6 espinas centrales y de 4-12 espinas radiales. Las flores miden de 3-6.5x3-6cm son rojas, a veces rosas y no presentan tricomas en el pericarpelo. El fruto es dehiscente y puede ser de color rosa, rojo, parduzco o amarillento (Fig. 1A) (Hunt, 2006).

### *Echinocereus polyacanthus*

Los individuos de esta especie poseen tallos cespitosos, generalmente formando grandes cúmulos. Los tallos poseen de 1 a 20 ramas cilíndricas erectas color verde, que miden 2-10cm, poseen de 10-11 costillas y de 1-4 espinas centrales de color pardo a negro y de 8-10 espinas radiales. Las flores miden de 4-7x3-4cm, el pericarpelo es pequeño y presenta numerosos tricomas. El fruto es ovoide y de color verde (Fig. 1B) (Hunt, 2006).



**Fig. 1.** Individuos del género *Echinocereus* **A.** *E. coccineus* **B.** *E. polyacanthus*

## **Sistemas reproductores en angiospermas**

Aproximadamente el 90% de las angiospermas produce flores bisexuales o hermafroditas, el 10% restante, evolucionó a la unisexualidad, separando los sexos espacialmente al desarrollarlos ya sea en diferentes flores o en diferentes individuos. 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; así como en el dioicismo, en el cual las flores femeninas (pistiladas) y masculinas (estaminadas) se encuentran en diferentes plantas (Ainsworth, 2000).

De acuerdo con Ainsworth (2000) existen otros sistemas reproductores que se originaron durante la evolución del sistema hermafrodita hacia los sistemas dioico y monoico en los que surgen flores unisexuales. Estos son:

1) Ginodioicismo, en el cual, las poblaciones están compuestas de plantas con flores femeninas y plantas con flores hermafroditas.

2) Androdioicismo, en el que las poblaciones tienen plantas con flores masculinas y plantas con flores hermafroditas.

3) Trioicismo, cuyas poblaciones tienen plantas con flores hermafroditas, plantas con flores femeninas y plantas con flores masculinas.

4) Ginomonoicismo, donde se presentan flores femeninas y hermafroditas en una misma planta.

5) Andromonoicismo, poblaciones con flores masculinas y hermafroditas en la misma planta.

6) Trimonoicismo, en el que una sola planta presenta flores hermafroditas, femeninas y masculinas.

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 a partir de linajes hermafroditas (Bawa, 1980).

## **Sistemas reproductores en la familia Cactaceae**

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 Cactaceae se han reportado 24 especies de ocho géneros con sistemas reproductores diferentes al hermafrodita, esta condición ha surgido de manera independiente en algunas especies de las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Orozco, 2002; Strittmatter *et al.*, 2006; Sánchez, 2007; Silva, 2007, Alfaro, 2008, Hernández, 2008, Camacho, 2009).

### ***Subfamilia Pereskioideae***

En esta subfamilia se han reportado cuatro especies con un sistema reproductor diferente al hermafrodita. *Pereskia. quisqueyana* Liogier se reporta como dioica, con flores masculinas o estaminadas que presentan lóbulos estigmáticos filiformes y sin papilas. Con estilo corto y el lóculo del ovario muy pequeño en el que los óvulos no se desarrollan o son anormales. En esta especie aún no se han observado las flores femeninas, por lo que no se escarta la idea de la existencia de poblaciones androdioicas (Leuenberger, 1986).

*P. zinniiflora* DC. presenta flores masculinas con lóbulos estigmáticos sin papilas, con estilo corto y ovario reducido con óvulos no desarrollados o anormales. Las flores femeninas presentan lóbulos estigmáticos bien desarrollados y papilados, el ovario con numerosos óvulos de placentación parietal, sin embargo los estambres son estériles (Areces, 1984; en Leuenberger; 1986).

En *P. portulacifolia* (L.) DC las flores masculinas presentan gineceo reducido y no funcional, el ovario es ínfero, unilocular y sin óvulos, un estilo corto denominado estilodio y un conjunto de lóbulos estigmáticos reducidos denominados estigmodio, presentan estambres con filamentos largos y gran cantidad de granos de polen. Las flores femeninas únicamente se han observado en ejemplares de herbario (Leuenberger, 1986; Camacho, 2009).

Más recientemente, Areces-Mallea (1992) reporta como especie dioica a *P. marcanoi* Areces, observó que las flores masculinas presentan numerosos estambres fértiles, estilo vestigial con algunos “lóbulos estigmáticos” filiformes y erectos, sin papilas, mientras que en las flores femeninas observó la presencia de múltiples lóbulos estigmáticos papilados y numerosos óvulos en el ovario, pero con los estambres reducidos y estériles.

## ***Subfamilia Opuntioideae***

En esta subfamilia se han reportado 12 especies de los géneros *Opuntia* y *Consolea* con sistemas reproductores diferentes al hermafrodita.

Del Castillo (1986), reporta poblaciones dioicas, trioicas y hermafroditas de *Opuntia robusta*. J.C, Wendl. Silva (2007) documenta el desarrollo de los dos morfos florales de una población dioica de *O. robusta*; la flor masculina tiene numerosas anteras que producen granos de polen, pero con el estigma reducido, ovario pequeño y sin óvulos, pero en algunos casos presentan primordios ovulares que no alcanzan la madurez. Las flores femeninas presentan un estigma de mayor tamaño con respecto al de las flores masculinas y gran cantidad de óvulos bien desarrollados. Las anteras de las flores femeninas degeneran después de la formación de las tétradas de microsporas, las cuales colapsan y no continúan su desarrollo, por lo que no se forman granos de polen.

Rebman (1998) describe a *Opuntia sanfelipensis*, señalando que se trata de una 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.

Anderson (2001) señala a *O. quitensis* F.A.C. Weber como especie con flores funcionalmente unisexuales, sin embargo no profundiza acerca de su sistema reproductivo.

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.

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. 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.

En el género *Consolea*; Strittmatter y Negrón-Ortiz (2000) encuentran que *Consolea rubescens* (Salm-Dyck ex D.C.) Lem es una 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.

Strittmatter *et al.* (2002), señalan a *Consolea spinosissima* Lem., como especie **subdioica**<sup>1</sup>, 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 estaminadas 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 sin ser fecundados. Las flores pistiladas tienen lóbulos estigmáticos bien desarrollados y ovarios llenos de óvulos. Los estambres tienen filamentos cortos y colapsados, las anteras son indehiscentes y sin polen.

Negrón-Ortiz y Strittmatter (2004) encuentran 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 agamosperimia. Aunque las flores empiezan su desarrollo como hermafroditas, los óvulos son abortados en la antesis. Las anteras tienen un proceso de desarrollo normal, produciendo granos de polen viables. Sus estudios sugieren que estas flores, 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) reporta 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 distinguen dos morfos florales: las flores pistiladas, en las que el desarrollo del grano de polen se detiene en etapa premeiótica, las células madre de la microspora degeneran al igual que las células del tapete, resultando anteras colapsadas sin polen, y las flores estaminadas en las que el saco embrionario degenera, resultando óvulos abortivos en la antesis.

<sup>1</sup>**Subdioico:** Sistema reproductor en el cual en una población se encuentran individuos masculinos, femeninos e individuos hermafroditas, estos últimos en bajas proporciones

## ***Subfamilia Cactoideae***

En esta subfamilia se han reportado ocho especies de cinco géneros, en las cuales se han observado flores unisexuales.

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

Sánchez (2007) realizó el estudio embriológico en una población de *Mamillaria dioica* K. Brandegees 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.

Kimmach (1982) reporta poblaciones ginodioicas y hermafroditas de la especie *Selenicereus innesii* Kimmach, 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 población estudiada por Kimmach podría ser funcionalmente hermafrodita debido a que las flores pistiladas presentan malformaciones por lo que son denominadas como neutras, es decir totalmente estériles. Sin embargo estos autores no presentan evidencias o detalles morfológicos de las flores neutras.

Fleming *et al.* (1994) describen la biología reproductiva de la especie trioica *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton & Rose, reportan cuatro morfos florales: pistiladas, estaminadas, hermafroditas y neutras. Las flores pistiladas presentan 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 tienen el gineceo y el androceo atrofiados, no producen granos de polen ni desarrollan óvulos. Nuñez (2004) reporta que el desarrollo de la antera en las flores femeninas es aparentemente normal, sin embargo la pared de calosa que rodea las microsporas es anormal y los granos de polen jóvenes sólo presentan restos de citoplasma colapsado, por lo que no son viables. Para las flores masculinas reporta dos tipos de óvulos anormales, el primer tipo que presenta funículos que finalizan en protuberancias nucleares

y no desarrollan tegumentos; en el segundo tipo los óvulos son amorfos, con la nucela cubierta parcial o totalmente por los tegumentos y el funículo.

Valiente-Banuet *et al.* (1997) reportan para la especie *Neobuxbaumia mezcalaensis* Bravo poblaciones con sistema reproductivo androdioico, en las plantas estaminadas y hermafroditas el androceo se encuentra bien desarrollado y es funcional; en las plantas estaminadas el gineceo se encuentra reducido y no presenta óvulos maduros. Sin embargo, Gómez (2010) reporta poblaciones de esta especie en la misma zona estudiada por Valiente-Banuet, en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán; donde las flores denominadas como masculinas presentan estigmas y estilos funcionales que permiten el crecimiento de los tubos polínicos. Si bien algunas flores presentan ovarios reducidos, éstas forman óvulos así como algunas semillas, concluyendo que la población no es androdioica sino hermafrodita y que la ausencia de óvulos maduros en algunas flores se debe a la presencia de parásitos y/o herbívoros y no al establecimiento genético de la unisexualidad floral.

Hoffman (1992), reporta para poblaciones dioicas de *Echinocereus coccineus* Engelm. que las flores masculinas son de mayor tamaño que las femeninas y 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. Por otra parte, en las flores femeninas las anteras no desarrollan granos de polen.

Baker (2006) describe a *Echinocereus yavapaiensis* como especie dioica. Señalando la presencia de plantas con flores masculinas con granos de polen fértil que no producen frutos, mientras que las plantas con flores femeninas producen granos de polen estériles.

Sánchez (2010) reporta poblaciones ginodioicas de *Echinocereus polyacanthus*, en las que encuentra dos morfos florales: la flor femenina, que posee gineceo bien desarrollado y anteras estériles; y la flor hermafrodita, con gineceo bien desarrollado y anteras que producen numerosos granos de polen.

## **Evidencia de muerte celular programada en flores unisexuales**

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 como daño físico, estrés, toxinas, etc; un ejemplo de esto es la necrosis, definida como muerte celular accidental o resultado de trauma; y 2) debido principalmente a factores endógenos, en la que el organismo controla el proceso de muerte celular, por lo que ésta se denomina muerte celular programada (MCP) (Nooden, 2004).

La MCP es parte del desarrollo normal de las plantas, está relacionada en procesos del desarrollo como la senescencia de las hojas, la formación de los órganos sexuales, la eliminación de las células de la aleurona, la remoción de las células de la caperuza de la raíz y la diferenciación de células especializadas como es el caso de los elementos traqueales. La MCP ocurre en el androceo y el gineceo, estando extensamente involucrada en el éxito de la reproducción (Wu & Cheung, 2000).

La MCP en la antera tiene un papel crítico en el desarrollo normal del polen, ya que si este proceso falla, los granos de polen se desarrollan anormalmente, lo que conduce a la esterilidad (Varnier, *et al.* 2005). Un ejemplo de MCP en el androceo es el de las células del tapete, un tejido de la antera cuya función es nutrir y guiar el desarrollo de las microsporas. El destino final del tapete es la degeneración de sus células, lo cual ocurre después de la meiosis con un patrón típico de MCP. Después de un periodo de actividad las células mueren para liberar secreciones que formarán la cubierta del grano de polen, la degradación prematura o retrasada del tapete está asociada con esterilidad masculina (Papini, *et al.* 1999; Balk y Leaver, 2001; Coimbra, 2004; Li, 2006).

En anteras de *Lilium* se ha demostrado que la MCP ocurre desde la meiosis hasta la maduración del grano de polen, en una secuencia que comienza en el tapete y se va extendiendo radialmente hacia las capas exteriores de la antera afectando todos los tejidos y promoviendo la dehiscencia (Varnier, *et al.* 2005).

En el gineceo, los patrones de MCP se pueden observar después de la meiosis de la célula madre de la megaspora, tres de las cuatro megasporas degeneran dejando únicamente una funcional; en el tejido de transmisión durante el crecimiento de los tubos polínicos, y una de las células sinérgidas degenera antes de la fecundación para permitir la entrada del tubo polínico al saco embrionario (Wu & Cheung, 2000).

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 por procesos de MCP (Greenberg, 1996).

El maíz 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. En etapas tempranas del desarrollo las flores son 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, MCP 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).

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, seguido por la detención del crecimiento del ovario. El desarrollo de los óvulos continúa hasta la etapa de saco embrionario, en esta etapa las células externas de la nucela y algunas capas de células tegumentarias degeneran por un proceso de muerte celular programada.

Para *Opuntia stenopetala*, Orozco (2002) describe que las anteras de las flores pistiladas se desarrollan de manera similar a las estaminadas hasta la etapa de célula madre de la microspora (cmmi). En esta etapa, las cmmi's experimentan algunas características estructurales típicas de MCP. Se observó compactación de la cromatina, aumento en el número y tamaño de vacuolas y colapso celular, lo cual ocasiona la separación de la pared. Asimismo se detectó fragmentación del DNA nuclear, la cual fue evidenciada mediante la prueba de TUNEL (Flores, 2005), sugiriendo que las cmmi's entran al programa de MCP, lo cual propicia la esterilidad masculina en este morfo floral. De igual forma el tapete se hipertrofia y en las otras capas de la pared de las anteras hay alteraciones, sugiriendo también MCP, lo cual fue corroborado por Alfaro (2008).

Para *Opuntia robusta* Hernández (2008) reporta que el DNA se encuentra fragmentado en los núcleos de las células del ovario y óvulos de las flores masculinas indicando la posibilidad de que la MCP esté implicada en la no funcionalidad de estas estructuras. Para las anteras de las flores femeninas de esta especie, Alfaro (2008) reporta evidencias de MCP en el tapete, en las cmmi y en otras capas de las anteras, encuentra que algunas cmmi si entran en meiosis y llegan a formar tétradas, las cuales presentan ciertas irregularidades, se colapsan y posteriormente degeneran antes de liberarse de la pared de calosa para formar al grano de polen joven.

Evidencias de MCP en las capas de la antera, también fueron observadas en las flores femeninas de *Consolea spinosissima*, *C. millspaughii*, *C. moniliformis*, *C. nashii* *C. picardeae*, *C. rubescens*. En estas especies la esterilidad masculina está asociada con anomalías en el desarrollo del tapete, sus células se hipertrofian alargándose radialmente y mostrando cambios ultraestructurales característicos de la MCP, lo que provoca que las células degeneren completamente durante la profase I. Asimismo la capa media de la antera que en las flores masculinas degenera al final de la meiosis, en las flores femeninas persiste y se alarga empujando las células del tapete hacia el centro del lóculo y para la anthesis tanto la capa media y el tapete ya han degenerado.(Strittmatter, *et al.* 2006).



## **HIPÓTESIS**

Dado que en diferentes poblaciones de *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* se han observado dos diferentes morfos florales, posiblemente estas especies presentan un sistema reproductor diferente al hermafrodita.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Describir el desarrollo de los órganos reproductores en individuos de *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* y a partir de los resultados determinar su sistema reproductor.

### **Objetivos particulares**

- Conocer el sistema reproductor y proporción de los morfos florales de *E. coccineus* y *E. polyacanthus*.
- Conocer la etapa del desarrollo floral y los tejidos que se ven afectados y que llevan a la funcionalidad de un sólo verticilo sexual.
- Determinar si existe muerte celular programada en los tejidos afectados.
- Determinar la funcionalidad de los estigmas y estilos en los morfos florales.
- Determinar la trayectoria de los tubos polínicos a través del estilo en ambos morfos florales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colecta y fijación**

El material biológico (flores y botones florales) de *E. coccineus* se colectó en el estado de Chihuahua, México, en los meses de marzo y abril de 2009 y 2010.

Localidad: Mpio. Juárez, a 4 km al Sur de Samalayuca, al pie de la montaña, 31° 19' 33.3" N 106° 29' 32.88" O, *D. Sánchez 48* (MEXU).

El material biológico de *E. polyacanthus* se colectó en el estado de Durango, México, en los meses de marzo y abril de 2009 y 2010.

Localidad: Mpio. Durango, en el km 39 de la carretera Durango-Mazatlán (MEX 40), 23° 55' 51.54" N 104° 54' 24.6" O, *D. Sánchez 12* (MEXU).

El sexado de la población de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* se determinó considerando las características de las anteras, como presencia o ausencia de polen, tanto en antesis como en botones florales avanzados en el desarrollo.

Posteriormente los botones florales y flores se disectaron retirando las unidades del perianto y parte del pericarpelo, el material se fijó y procesó de acuerdo a las técnicas empleadas.

De acuerdo al tamaño de los botones florales y flores se establecieron ocho etapas de desarrollo, las cuales se utilizaron para describir la embriología (Tabla 1).

**Tabla 1.** Etapas de desarrollo floral establecidas.

ETAPA	LONGITUD (mm)
1	9.0 – 11.9
2	12.0 – 13.9
3	14.0 – 18.9
4	19.0 – 24.9
5	25.0 – 29.9
6	30.0 – 34.9
7	35.0 – 39.9
8	40.0 – 49.9 (antesis)

### **Inclusión y cortes histológicos**

El material a utilizar para microscopía óptica se fijó en FAA (Formaldehído 10%, Ácido acético 5% y Alcohol etílico 50%). Posteriormente, se lavó con agua destilada haciendo tres cambios de 15 min cada uno y se deshidrató gradualmente en etanol 50%, 70%, 85%, 96% y dos cambios de etanol absoluto, 30 min en cada uno. A continuación, se colocó en xilol por 15 min y después en una mezcla de xilol:paraplast, en proporción 1:1 durante 24 h a 60 °C. Se infiltró en paraplast puro durante 24 h a 60 °C. Finalmente se incluyó en Paraplast puro y se realizaron cortes de 5-7 µm de grosor en el micrótopo rotatorio American Optical 820, los cuales se tiñeron con safranina-verde rápido.

El material que se utilizó para las pruebas inmunológicas se fijó en formaldehído al 4% en buffer de PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 2mM. pH 7.3)

1X, posteriormente se enjuagó con el mismo buffer, haciendo 3 cambios de 15 min cada uno. Las estructuras disectadas se deshidrataron gradualmente en etanol 50%, 70%, 85%, 96% y 100% (dos cambios), 30 min en cada uno. Parte del material se incluyó en paraplast siguiendo el protocolo antes mencionado, mientras otra parte del material, se infiltró en resina LR-White:etanol absoluto en una proporción 1:1 por 24 h y a 4 °C y luego en LR-White puro por 12 h a 4 °C (dos cambios). Las muestras se incluyeron en LR-White puro en cápsulas de gelatina y se polimerizaron a 56°C en ausencia de oxígeno. Los bloques obtenidos se cortaron a 1-2 µm de grosor en un ultramicrotomo JMC MT990.

### **Observación al microscopio electrónico de barrido**

Para las observaciones en el microscopio electrónico de barrido el material fijado en FAA se deshidrató en etanoles graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) durante 2 h en cada uno. Las muestras se llevaron a punto crítico con CO<sub>2</sub> y se montaron en portamuestras de aluminio cubriéndolos con una capa fina de oro. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5310LV y se tomaron fotografías.

### **Análisis cuantitativo de caracteres**

Para realizar la medición y conteo de algunas estructuras florales, 32 flores en anthesis fueron fijadas en FAA y luego enjuagadas en agua destilada. Posteriormente se disectaron el androceo y gineceo y se tomaron las siguientes mediciones: longitud de estambres, anteras, estilo, estigma, y ovario, número de lóbulos estigmáticos, anteras y óvulos y ancho del ovario. Con los valores obtenidos se realizó una prueba *t* de student (Statgraphics Centurion XV.I, 2006) para conocer si existen diferencias entre ellos.

### **Observación de tubos polínicos**

Tanto en el campo como en individuos de la colección del Jardín Botánico de la UNAM se realizaron polinizaciones manuales en estigmas receptivos. Una parte de los pistilos se fijaron en FAA después de 72hr. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se colocaron en una solución de NaSO<sub>3</sub>, y se pusieron en un autoclave, manteniéndolos a 134 °C y 2.1 bar por 15 min. El material se lavó con agua destilada y se colocó en azul de anilina decolorado al 1% en K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.1N durante toda la noche en oscuridad a 4 °C. Finalmente, los pistilos se aplastaron (“squash”) entre un cubreobjetos y un portaobjetos. Las preparaciones se sellaron con barniz de uñas y se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus Provis AX750 para evidenciar la calosa

de los tubos polínicos. La otra parte de las flores, continuaron el desarrollo para observar la producción de frutos.

## **Prueba de TUNEL**

Para la prueba de TUNEL los cortes hechos en paraplast se colocaron en portaobjetos especiales Superfrost (Fisher) para inmunolocalización, luego se desparafinaron por 30 min a 60 °C, y se sumergieron en Slidebrite Biocare Medical dos cambios de 15 min cada uno. A continuación, se hidrataron en etanoles graduales (100%, 96%, 85%, 70%, 50%,) durante 10 min en cada uno y finalmente se lavaron con buffer de PBS, dos cambios de 10 min cada uno. Los cortes realizados en LR-White se colocaron en portaobjetos especiales Superfrost (Fisher) para inmunolocalización, luego se hidrataron en buffer de PBS 1X por 15 min.

Posteriormente se les agregó proteinasa K (dos gotas) y se incubaron a 30-35 °C por 15 min. Después las preparaciones se lavaron tres veces con buffer de PBS 1X, cada uno por 5 min.

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.

Para el **Control positivo**: Se agregaron 50 µL de la solución con DNasa I (3000 U/mL de DNasa, 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 30 min a 30 °C. Después, se lavaron tres veces con buffer PBS 1X cada uno por tres minutos. Se añadieron 50 µL de la reacción de TUNEL Roche Applied Science, los cortes se cubrieron con parafilm y se incubaron por 1:30 h en una cámara húmeda, en oscuridad a temperatura ambiente.

Al resto de las muestras se les agregaron 50 µL 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 cuatro 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.

Las preparaciones se guardaron a 4 °C en oscuridad para ser observadas al microscopio confocal.

## RESULTADOS

En esta sección se describe el desarrollo del androceo y gineceo de las flores de *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus*. Asimismo, se presentan las evidencias embriológicas que permitieron determinar el sistema reproductor. Ambas poblaciones son dioicas, no se encontraron hermafroditas.

En las poblaciones visitadas, se hizo un conteo del número de individuos por morfo, encontrando en la población de *E. coccineus* 19 individuos funcionalmente masculinos y 18 individuos funcionalmente femeninos. En la población de *E. polyacanthus* se encontraron 19 individuos funcionalmente masculinos y 15 individuos funcionalmente femeninos.

## DESARROLLO

### *Echinocereus coccineus*

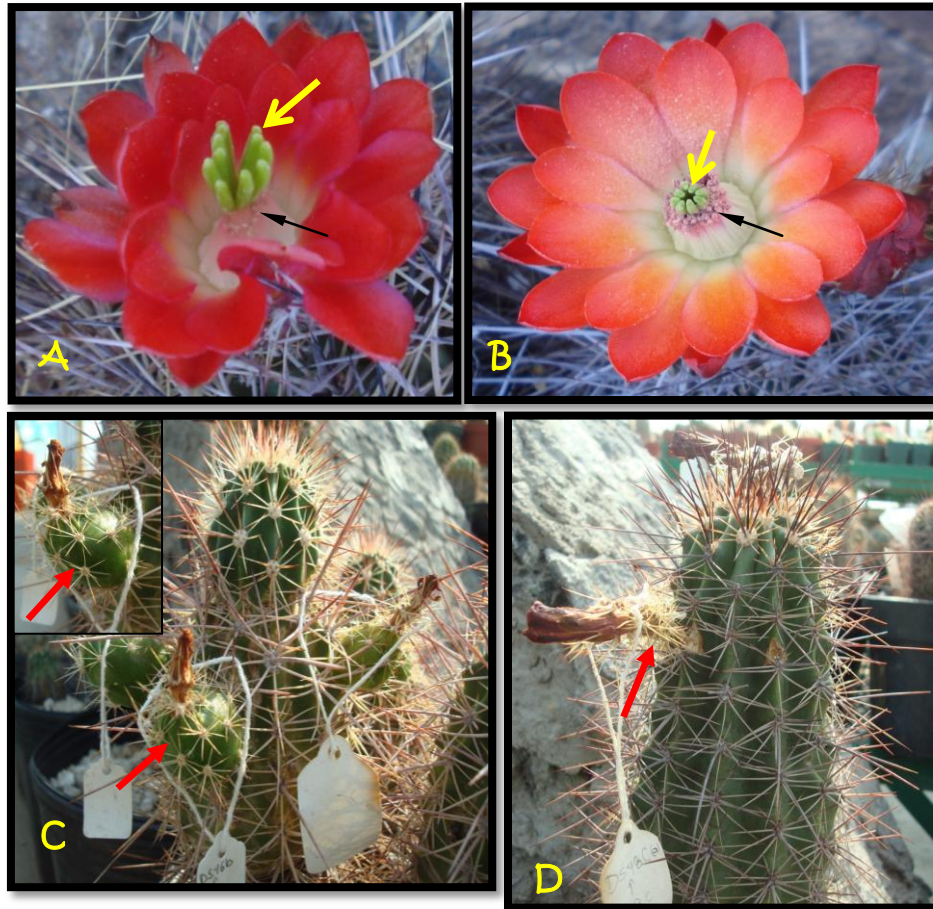
**Sistema de reproducción sexual:** funcionalmente dioico. Las flores aunque aparentan ser hermafroditas presentan atrofia de alguno de los verticilos sexuales, por lo cual se encontraron individuos femeninos y masculinos. Los individuos femeninos tienen flores con anteras colapsadas de color amarillo claro (Fig. 2A). El gineceo está bien desarrollado, con un estigma con múltiples lóbulos y un ovario con numerosos óvulos. La presencia de frutos indica que alcanzan la madurez y forman semillas tanto en poblaciones naturales como en los individuos *ex situ* que fueron polinizados manualmente (Fig.2C). Los individuos masculinos tienen flores con anteras de color rosa y con numerosos granos de polen. El gineceo está reducido, el estigma es más pequeño en relación con el de las flores femeninas, sin embargo el ovario produce óvulos aparentemente maduros (Fig. 2B), aunque no se detectó la formación de fruto ni en campo ni *ex situ* por polinizaciones manuales controladas (Fig. 2D).

### **Desarrollo del androceo**

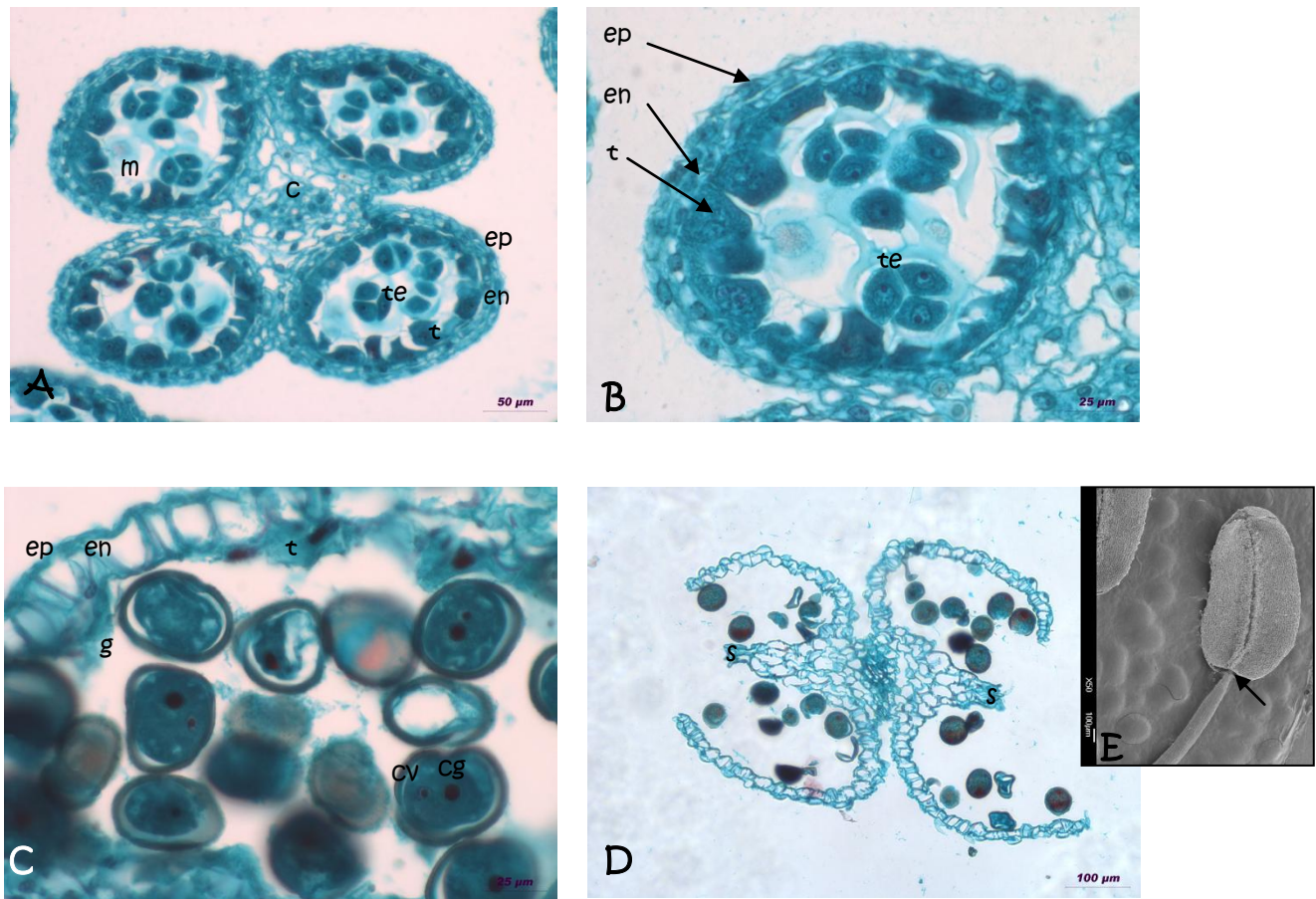
*Flores funcionalmente masculinas.* Mediante cortes transversales de anteras, se observó el desarrollo de éstas.. En la etapa cuatro, correspondiente a la de células madres de las microsporas, se observó una pared de antera formada de cuatro capas celulares: epidermis, endotecio, una capa media y el tapete binucleado tipo secretor. En la etapa cinco, se observaron tétradas tetrahédricas

en los lóculos de las anteras, rodeadas de calosa. En esta etapa, la epidermis, el endotecio y el tapete persisten, mientras que las células de la capa media se han colapsado (Fig. 3A, 3B). Posteriormente, en las etapas seis y siete en los microsporangios se encontraron una gran cantidad de granos de polen unicelulares y bicelulares, respectivamente, para estas etapas únicamente se pueden observar los restos del tapete, el cual ya ha degenerado para asegurar la maduración apropiada del polen (Fig. 3C). En la etapa ocho, se observaron las anteras dehiscentes (Fig. 3D), la epidermis y el endotecio permanecen como únicas capas de la pared de la antera. Se observó colapsado el ápice del filamento en la zona de unión a la antera (Fig. 3E).

*Flores funcionalmente femeninas.* En los cortes transversales de las anteras, en la etapa cuatro que corresponde a la etapa de células madres de las microsporas, se observaron cuatro lóculos. La pared de la antera presentó cuatro estratos celulares, la epidermis, el endotecio, una capa media y el tapete, pero con la peculiaridad de que éste empieza a colapsarse en esta etapa (Fig. 4A). En las etapas posteriores, las capas celulares de las anteras se colapsan paulatinamente, así como algunas células madre de la microspora, las cuales se encuentran reducidas en tamaño y no entran a meiosis, ni se rodean de calosa (Fig. 4B, 4C). Para la etapa ocho que corresponde a la antesis, las células se observaron completamente colapsadas y el endotecio tiene engrosamientos en sus paredes, el ápice del filamento se observó mucho más colapsado en la zona de unión a la antera que en las flores masculinas (Fig. 4D).

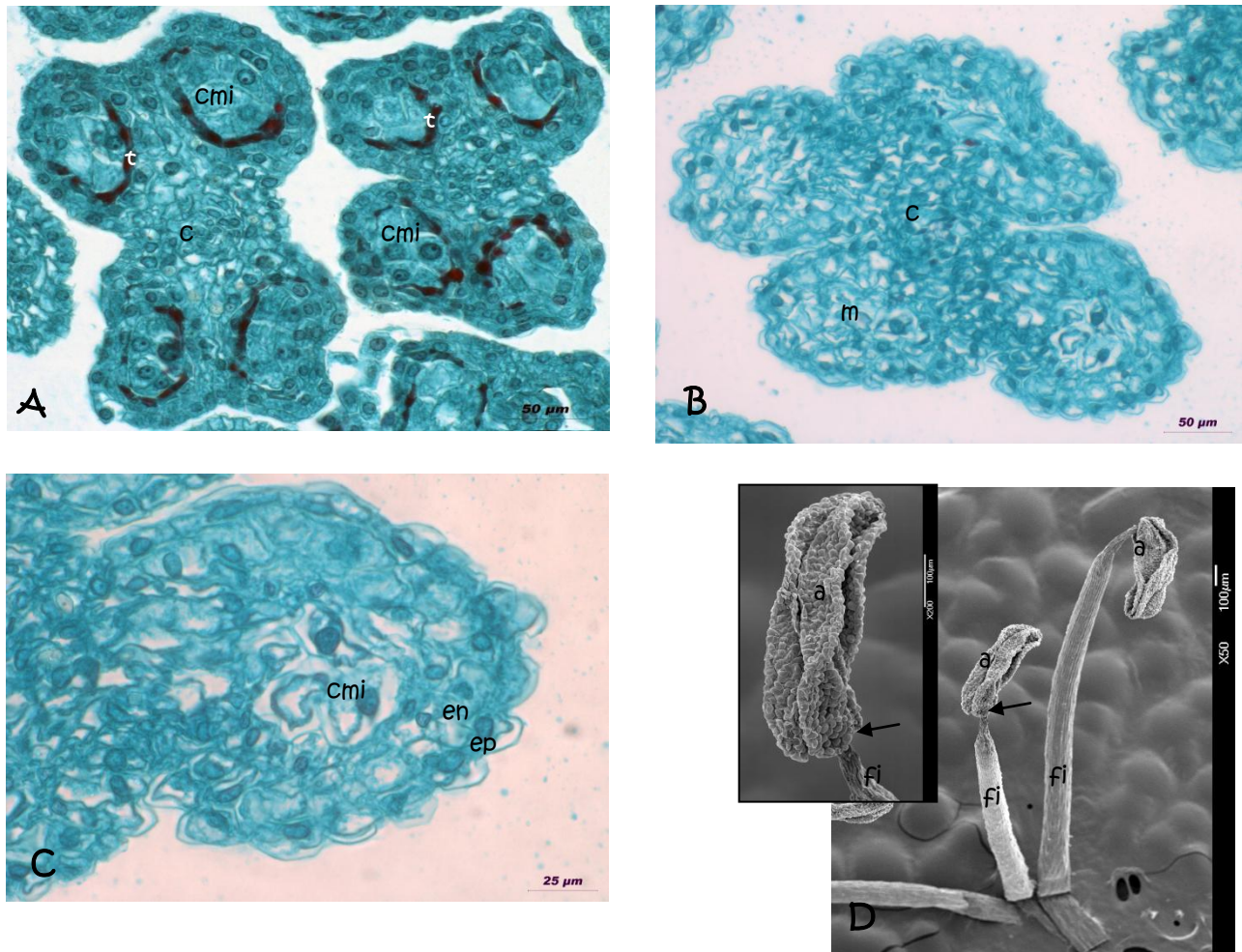


**Fig. 2.** Individuos de la población de *E.coccineus*. **A.** Flor funcionalmente femenina, se observan los lóbulos divergentes del estigma (flecha amarilla) bien desarrollados y las anteras colapsadas de color amarillo claro (flecha negra). **B.** Flor funcionalmente masculina. La flecha negra indica las anteras, que son funcionales y son de color rosa. Se observa el estigma con lóbulos cerrados (flecha amarilla) **C.** Individuo funcionalmente femenino, después de 12 semanas de la polinización se observa el fruto (flechas). **D.** Individuo funcionalmente masculino, las flores 12 semanas post-polinización se observan secas y no se ensanchan, indicando que no se forma fruto (flecha).



**Fig. 3.** Desarrollo de la antera y granos de polen en las flores funcionalmente masculinas de *E. coccineus*. **A.** Corte transversal de la antera, se observan cuatro microsporangios, dentro de ellos se encuentran tétradas tetrahédricas rodeadas de calosa y las capas de la pared de la antera (Etapa 5). **B.** Acercamiento a un microsporangio, se observa la epidermis y el endotecio de la pared de la antera, seguido por el tapete que es multinucleado. Dentro del microsporangio se observan tétradas tetrahédricas (Etapa 5) **C.** Acercamiento al microsporangio, se observan granos de polen bicelulares, pared de antera con la epidermis, el endotecio con engrosamientos y restos del tapete (Etapa 7). **D.** Corte transversal de una antera dehiscente con granos de polen, se mantiene la epidermis y el endotecio. **E.** Antera dehiscente, la flecha indica el colapso del filamento en la zona de unión a la antera (Etapa 8). **c**, tejido conectivo; **cg**, célula generatriz; **cv**, célula vegetativa; **en**, endotecio; **ep**, epidermis; **g**, grano de polen; **m**, microsporangio; **s**, septo; **t**, tapete; **te**, tétrada.





**Fig. 4.** Desarrollo del androceo en las flores funcionalmente femeninas de *E. coccineus* **A.** Corte transversal de la antera en etapa cuatro, se observan cuatro microsporangios, dentro de ellos algunas células madres de las microsporas y el tapete colapsado. **B.** Corte transversal de la antera, con todas las células colapsadas (Etapa 5) **C.** Acercamiento al microsporangio, se observan colapsadas tanto las células de la pared de la antera como las células madres de las microsporas (Etapa 5). **D.** Fotomicrografía en MEB de anteras, se observa la antera colapsada, las flechas indican el colapso del filamento en la zona de unión a la antera (Etapa 8). **c**, tejido conectivo; **cmi**, célula madre de la microspora; **en**, endotegio; **ep**, epidermis; **m**, microsporangio; **t**, tapete.

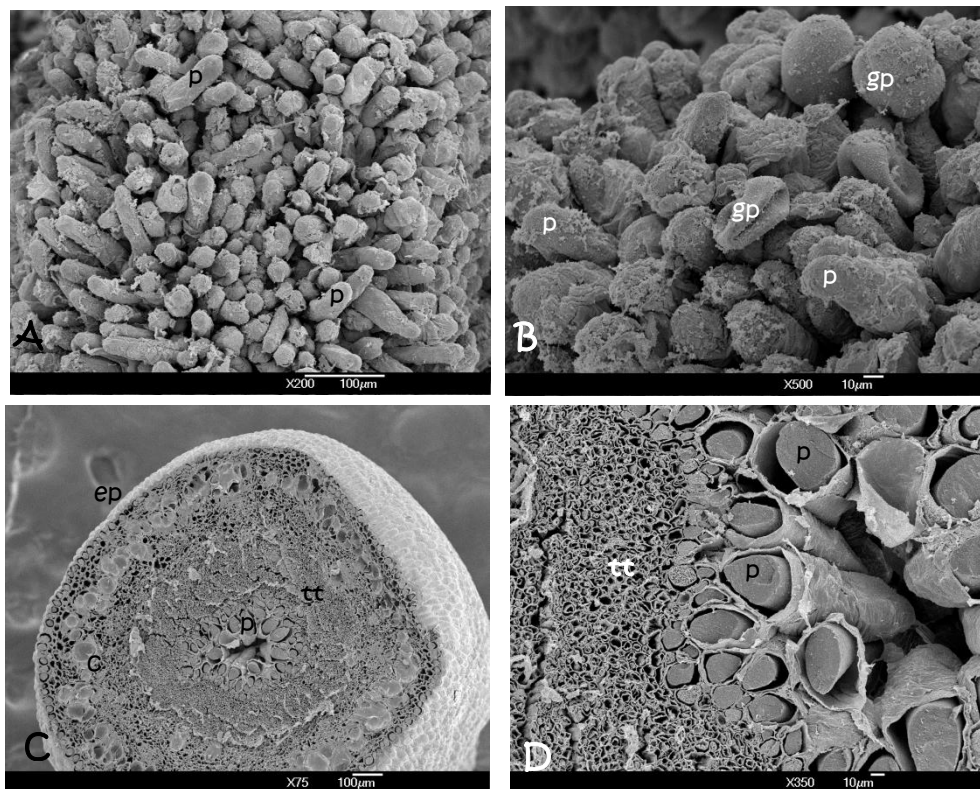
## Desarrollo del gineceo

### *Flores funcionalmente femeninas.*

**Estigma.** Los estigmas están formados por alrededor de 10 lóbulos estigmáticos, cada uno con numerosas papilas unicelulares que se van alargando conforme avanza el desarrollo (Fig. 5A). En cortes transversales, se observa cada lóbulo rodeado por papilas que contienen taninos. Adyacentes

a ellas se encuentran varios estratos de células de tejido de transmisión, que son más pequeñas y con citoplasma denso. Dentro de cada lóbulo se observa un haz vascular. En etapa 8 (antesis) se observaron granos de polen germinados sobre las papilas, que en esta etapa están cubiertas de secreción (Fig. 5B).

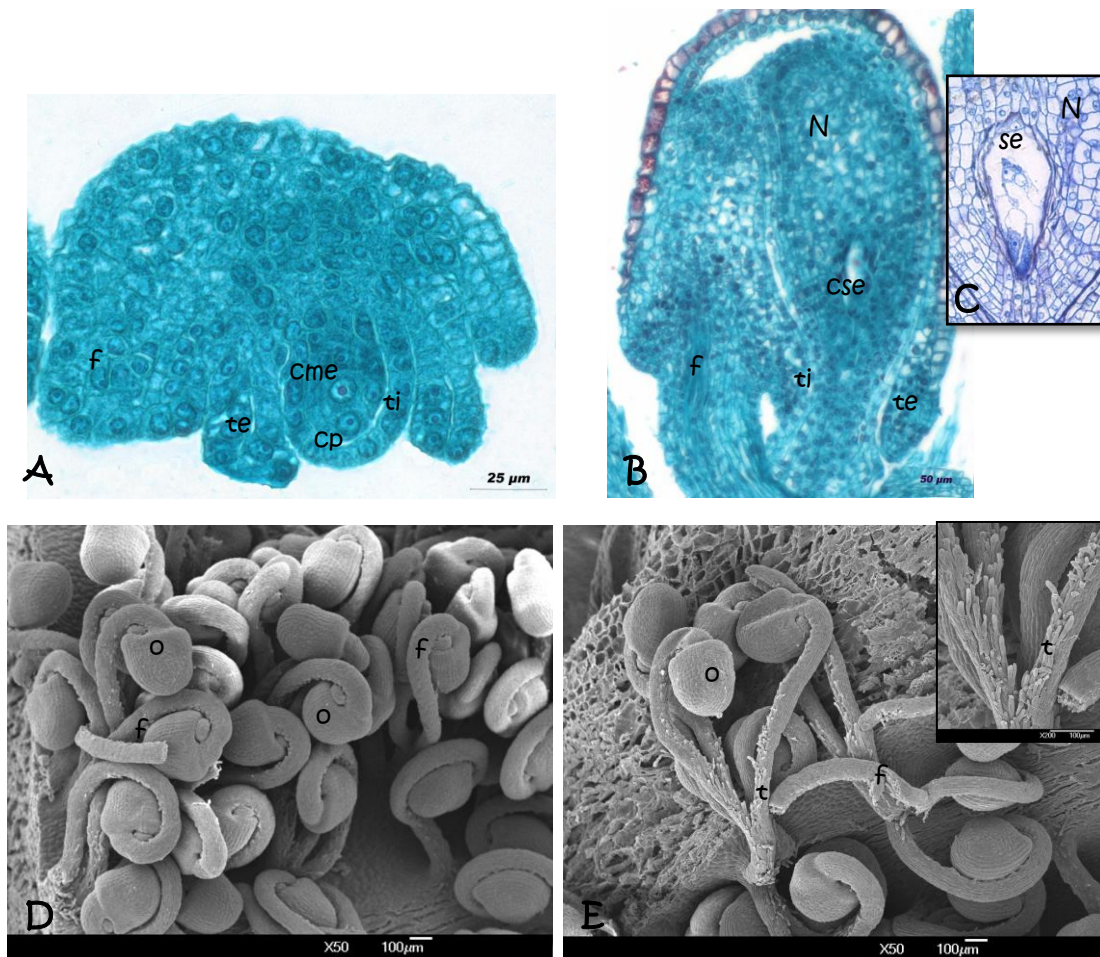
**Estilo.** Los lóbulos estigmáticos se juntan en un único estilo, en cuyo centro se observa un canal estilar formado por las células de la epidermis interna del estilo, las cuales son como papilas alargadas y adyacente a ellas se observan las células del tejido de transmisión, el córtex con células de mucílago y la epidermis (Fig. 5C, D).



**Fig. 5.** Características morfológicas del gineceo de las flores femeninas de *E. coccineus*. **A.** Acercamiento a las papilas estigmáticas, se observan alargadas y cubiertas de secreción. **B.** Granos de polen adheridos a las papilas estigmáticas. **C.** Corte transversal del estilo, se observa en el centro el canal estilar rodeado por papilas, el tejido de transmisión, el córtex y la epidermis externa. **D.** Acercamiento al canal estilar, se observa la epidermis interna en forma de papilas que recubren el canal estilar y el tejido de transmisión. **c**, córtex; **ep**, epidermis; **gp**, grano de polen; **p**, papilas estigmáticas; **tt**, tejido de transmisión.

**Óvulos.** En los cortes transversales de óvulos en etapa de célula arqueosporial (etapa 1) se observan primordios ovulares. En las etapas 3 y 4, los óvulos se encuentran en etapa de célula madre de la megaspora (cmme) y se observan los primordios del tegumento externo y del tegumento interno.

La célula arquesporial se ha dividido en la célula parietal, que dará origen a la nucela y en la cmme (Fig. 6A). Para la etapa seis se puede observar que el óvulo es crasinucelado, anátropo, bitégmico (Fig. 6B) y ya se encuentra formado el saco embrionario (Fig.6C). El tegumento interno forma el micrópilo y el funículo es muy largo (Fig. 6C). En los ovarios de flores en anthesis, los óvulos se encuentran arreglados en racimos, los funículos son mucho más largos y se observaron largos tricomas en su epidermis, del lado donde se curva el óvulo (Fig. 6D, E).



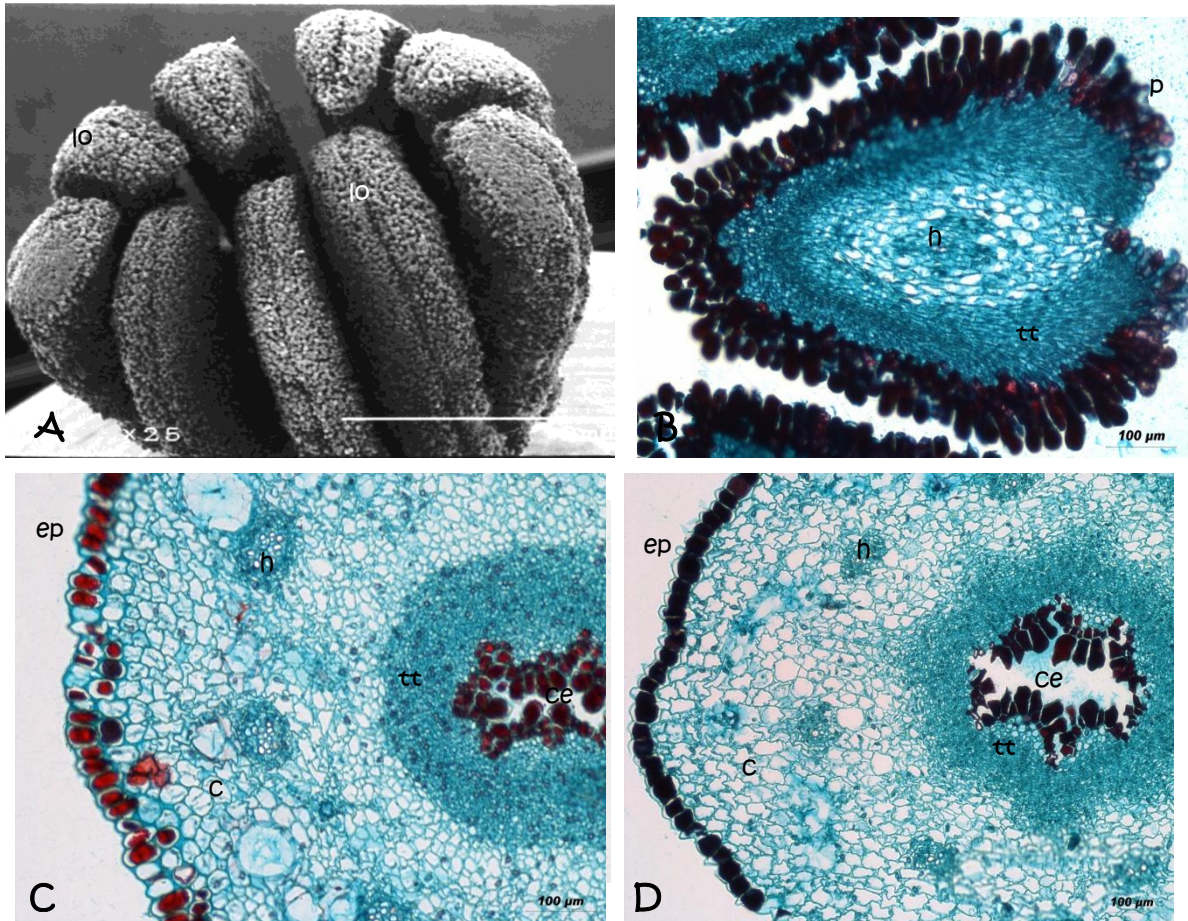
**Fig. 6.** Desarrollo de los óvulos de flores funcionalmente femeninas de *E. coccineus*. **A.** Se observa un óvulo en etapa de célula madre de la megaspora, con primordios de tegumento interno y del tegumento externo. (Etapa 3) **B.** Óvulo maduro, se observan las células del saco embrionario, el funículo y micrópilo (Etapa 6). **C.** Acercamiento al saco embrionario. **D.** Panorámica del ovario. **E.** Acercamiento a un racimo de óvulos, en el recuadro se muestra un acercamiento a los tricomas de la epidermis de los funículos. **cme**, célula madre de la megaspora; **cp**, célula parietal; **cse**, células del saco embrionario; **f**, funículo; **N**, nucela; **o**, óvulo; **se**, saco embrionario **t**, tricomas; **te**, tegumento externo; **ti**, tegumento interno.

*Flores funcionalmente masculinas.*

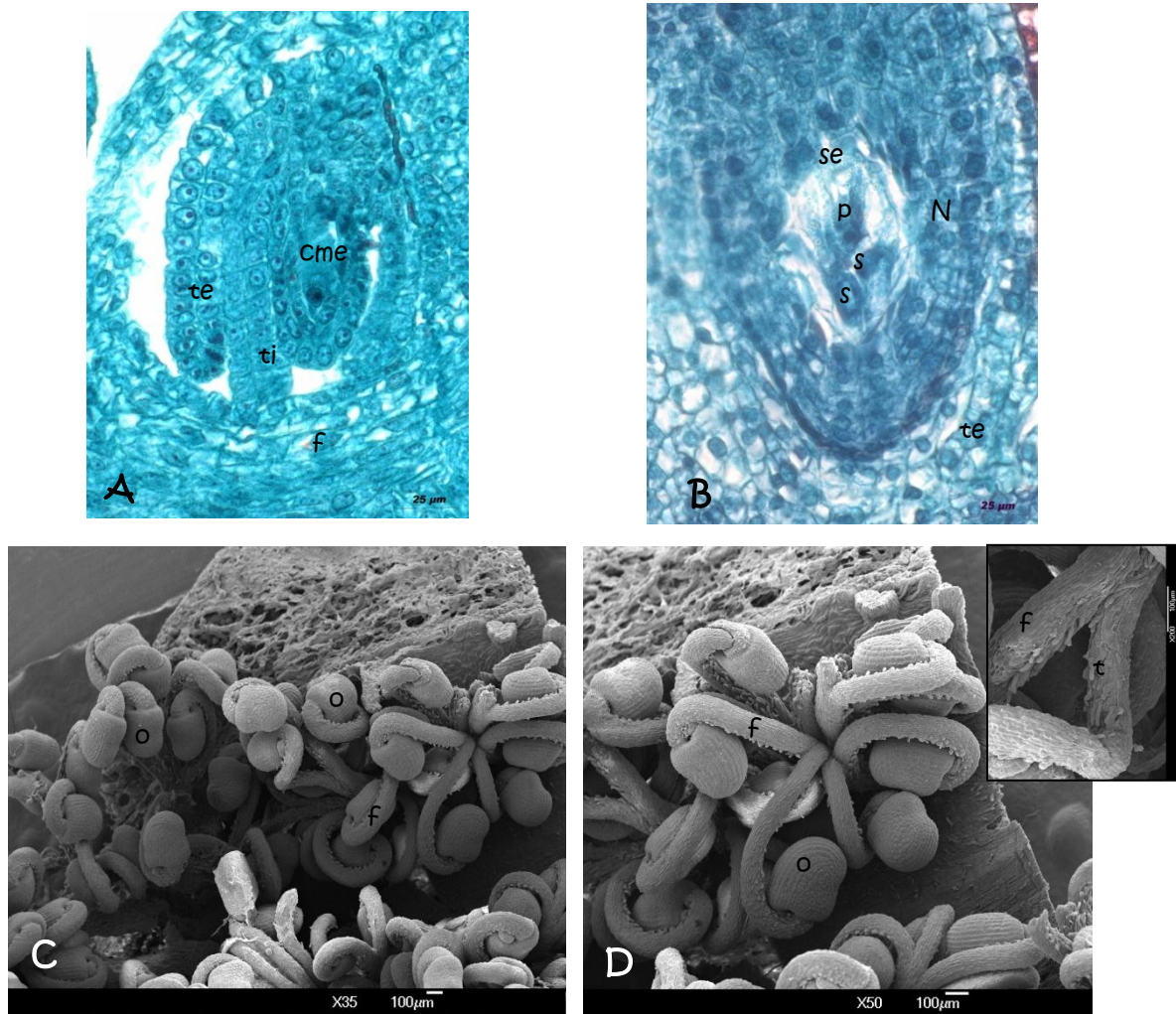
**Estigma.** En promedio se encontraron en los estigmas siete lóbulos estigmáticos con numerosas papilas, las cuales se van alargando conforme avanza el desarrollo (Fig.7A). En cortes transversales de estigma en todas las etapas se observa cada lóbulo rodeado por papilas que contienen taninos. Adyacentes a ellas se encuentra el tejido de transmisión cuyas células son más pequeñas y tienen citoplasma denso, dentro de cada lóbulo se observa un haz vascular (Fig. 7B).

**Estilo.** Los lóbulos estigmáticos se juntan en un único estilo, en el centro de éste se observa el canal estilar formado por células papiladas de la epidermis interna con taninos. Adyacente a estas células, se observan varios estratos de tejido de transmisión, éste se encuentra reducido con respecto al número de estratos presentes en las flores femeninas, las células del córtex con algunas células de mucílago, haces vasculares y la epidermis externa también con taninos (Fig. 7C,D).

**Óvulos.** En las flores de etapas 2 y 3, dentro del ovario se pueden observar numerosos óvulos con dos tegumentos y la célula madre de la megaspóra (Fig. 8A). Para la etapa seis, se observa el saco embrionario bien desarrollado (Fig. 8B). En las flores en etapa de antesis, los ovarios tienen gran cantidad de óvulos, los cuales se arreglan en forma de racimo y tienen funículos largos que presentan tricomas en la epidermis, del lado donde se curva el óvulo (Fig. 8C, D).



**Fig. 7.** Características morfológicas del gineceo de las flores masculinas de *Echinocereus coccineus*. **A.** Panorámica del estigma, se observan los lóbulos estigmáticos. **B.** Corte transversal de un lóbulo estigmático. **C.** Corte transversal del estilo de una flor femenina, se observa en el centro el canal estilar rodeado por papilas, el tejido de transmisión, el córtex, haces vasculares y la epidermis externa. **D.** Corte transversal del estilo de una flor masculina, se observa al centro el canal estilar, la epidermis interna en forma de papilas que recubren el canal estilar y se encuentran adyacentes al tejido de transmisión. Se observan menos estratos celulares del tejido de transmisión con respecto al de las flores femeninas. **c,** córtex; **ce,** canal estilar; **ep,** epidermis; **h,** haz vascular; **lo,** lóbulo estigmático; **p,** papilas estigmáticas; **tt,** tejido de transmisión.



**Fig. 8.** Desarrollo de los óvulos de flores funcionalmente masculinas de *Echinocereus coccineus*. **A.** Se observa un óvulo en etapa de célula madre de la megaspora, con el tegumento interno y el tegumento externo. (Etapa 3) **B.** Células del saco embrionario (Etapa 6). **C.** panorámica del ovario. **D.** acercamiento a un racimo de óvulos, en el recuadro se muestran los tricomas de la epidermis del funículo. **cme**, célula madre de la megaspora; **f**, funículo; **N**, nucela; **o**, óvulo; **p**, núcleos polares; **s**, célula sinérgida; **se**, saco embrionario; **t**, tricomas; **te**, tegumento externo; **ti**, tegumento interno.

### *Echinocereus polyacanthus*

**Sistema de reproducción sexual:** Funcionalmente dioico. Las flores aunque aparentemente hermafroditas, presentan alguno de los verticilos sexuales atrofiados. Los individuos femeninos presentan anteras colapsadas de color amarillo, el gineceo bien desarrollado con un estigma que tiene lóbulos estigmáticos divergentes (Fig. 9A) y los óvulos maduran hasta formar semillas (Fig. 9C). Los individuos masculinos tienen flores con anteras rosas y con numerosos granos de polen, el estigma se observa reducido en comparación al encontrado en las flores femeninas (Fig. 9B) y

presentan numerosos óvulos maduros, pero posteriormente en etapa madura no se producen ni frutos ni semillas (Fig. 9D).



**Fig. 9.** Individuos de la población de *E. polyacanthus*. **A.** Flor funcionalmente femenina, se observan los lóbulos del estigma (flecha amarilla) bien desarrollados y las anteras colapsadas y sin polen (flecha negra). **B.** Flor funcionalmente masculina. Se observa el estigma con lóbulos cerrados (flecha amarilla), la flecha negra indica las anteras, que son funcionales y producen polen. **C.** Individuo funcionalmente femenino, se observa fruto (flecha). **D.** Individuo funcionalmente masculino, las flores post-antesis se observan secas y no se ensancha el pericarpelo como indicador de que no se forma fruto (flechas).

### Desarrollo del androceo

*Flores funcionalmente masculinas.* Se siguió el desarrollo de las anteras mediante cortes transversales, encontrando que en la etapa tres la pared de antera está formada de cuatro capas celulares: la epidermis, el endotecio, la capa media y el tapete; éste último es multinucleado y de tipo secretor. Dentro de los microsporangios se observan células madres de las microsporas (Fig. 10A, B). Para la etapa seis, ya están formados los granos de polen y el tapete ya ha degenerado

para asegurar la maduración apropiada del polen. La pared de la antera sólo está compuesta por epidermis y endotecio con engrosamientos, asimismo las células de la capa media se han colapsado (Fig. 10C, D).

*Flores funcionalmente femeninas.* En la etapa dos, se observan en las anteras, cuatro lóculos, en cada uno de ellos la pared está conformada por cuatro capas celulares: la epidermis, el endotecio, la capa media y el tapete. A diferencia de las flores masculinas, el tapete comienza a colapsarse en esta etapa que corresponde a la etapa de células madres de las microsporas (Fig. 11A, B). Para etapas posteriores, las anteras se encuentran completamente colapsadas, así como algunas células madres de las microsporas que no entran a meiosis. Éstas se observaron reducidas y no se rodean de calosa. Los esporangios están reducidos aunque se mantiene la epidermis y el endotecio con engrosamientos (Fig. 11C, D, E). Se observan los estambres completamente colapsados (Fig. 11F).

## **Desarrollo del gineceo**

*Flores funcionalmente femeninas.*

**Estigma.** Se encontraron en los estigmas aproximadamente siete lóbulos estigmáticos (Fig. 12A), cada uno de ellos rodeado de numerosas papilas que se van alargando conforme avanza el desarrollo. En cortes transversales se observa el tejido de transmisión adyacente a las papilas y en cada lóbulo se presenta un haz vascular (Fig. 12C). Para la antesis, las papilas se encuentran cubiertas de secreción y en esta etapa en el ápice de los lóbulos se observaron granos de polen (Fig. 12B)

**Estilo.** Los lóbulos estigmáticos se juntan en un único estilo, en el centro de éste se observa un canal estilar, formado por las células de la epidermis interna que son como papilas y contienen taninos. Adyacente a esta epidermis se encuentran varios estratos del tejido de transmisión, haces vasculares, córtex y epidermis externa también con taninos (Fig. 12D, E).

**Óvulo.** En los cortes transversales de ovarios de flores en etapa uno, se observan primordios ovulares (Fig. 13A). En etapa tres, en los óvulos ya se ha formado la célula madre de la megaspora y se observan los tegumentos interno y externo (Fig. 13B). Para las etapas cuatro y cinco, ya se encuentra formado el saco embrionario. En antesis, los ovarios contienen gran cantidad de óvulos maduros que presentan funículos largos con numerosos tricomas en la epidermis, en esta etapa incluso se observaron algunos tubos polínicos creciendo en dichos tricomas (Fig. 13C-F).

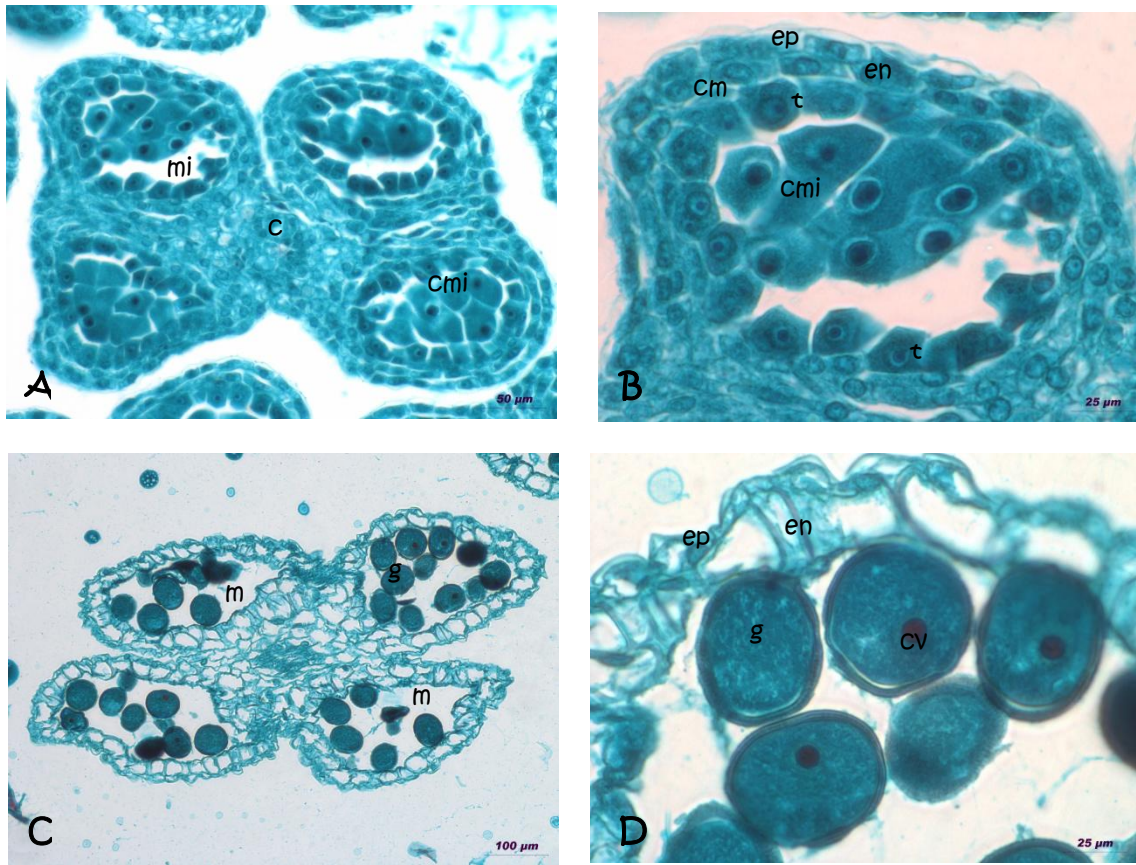


*Flores funcionalmente masculinas.*

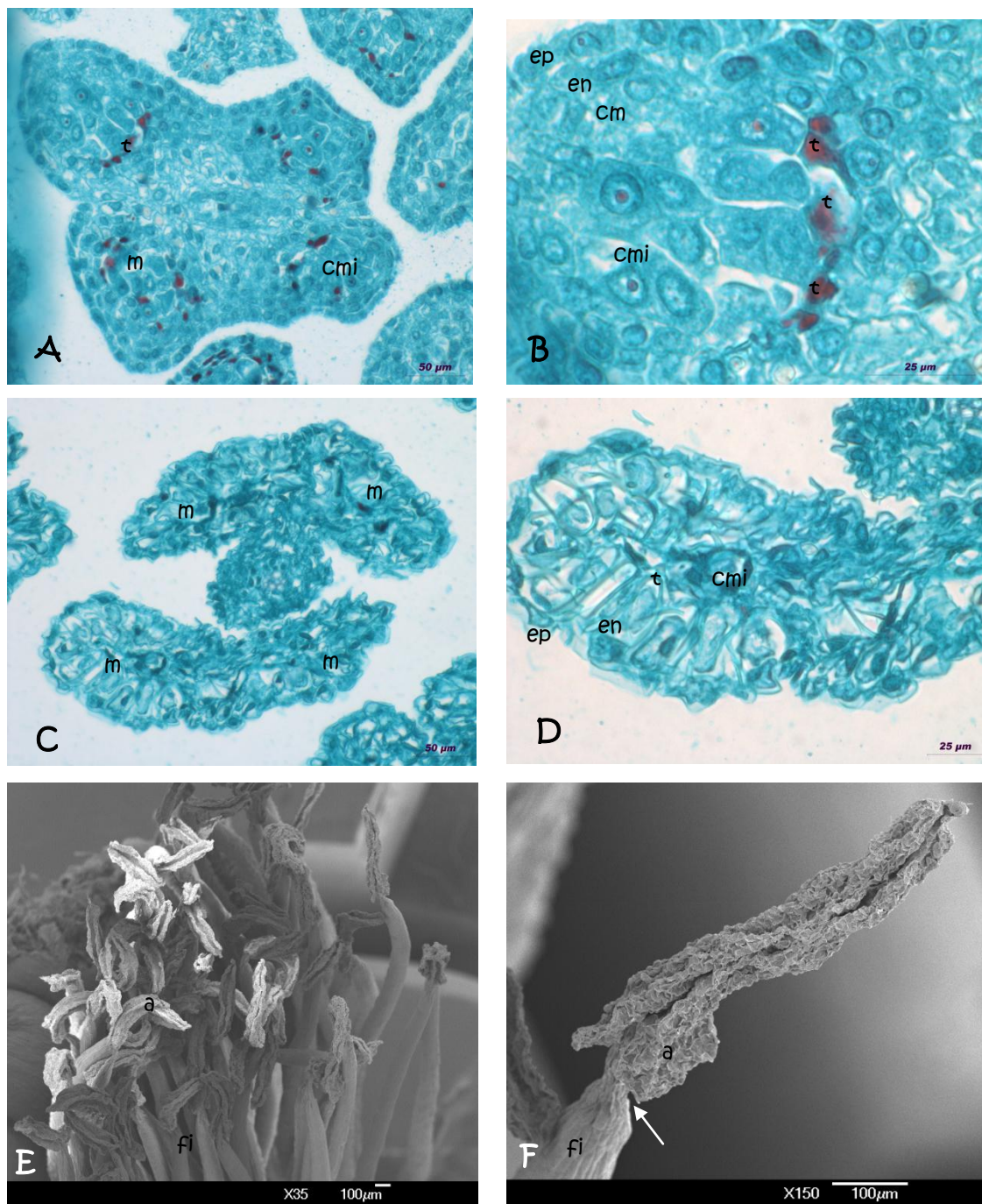
**Estigma.** En los estigmas se encontraron alrededor de siete lóbulos estigmáticos (Fig. 14A), cada uno de ellos rodeado por numerosas papilas redondeadas que en la antesis se encuentran cubiertas de secreción, y sobre ellas se observan adheridos granos de polen (Fig. 14B). En cortes transversales de lóbulos estigmáticos se observan varios estratos de tejido de transmisión adyacentes a las papilas estigmáticas, en cada lóbulo se observa un haz vascular (recuadro Fig.14A).

**Estilo.** Los lóbulos estigmáticos se juntan en un único estilo, en el centro de éste se observa en el centro el canal estilar rodeado de células papiladas de la epidermis interna del estilo que contienen taninos. Junto a ellas se observa el tejido de transmisión, que se encuentra reducido en comparación con el de las flores femeninas (Fig. 12E), haces vasculares, el córtex y la epidermis externa también con taninos (Fig. 14C, D).

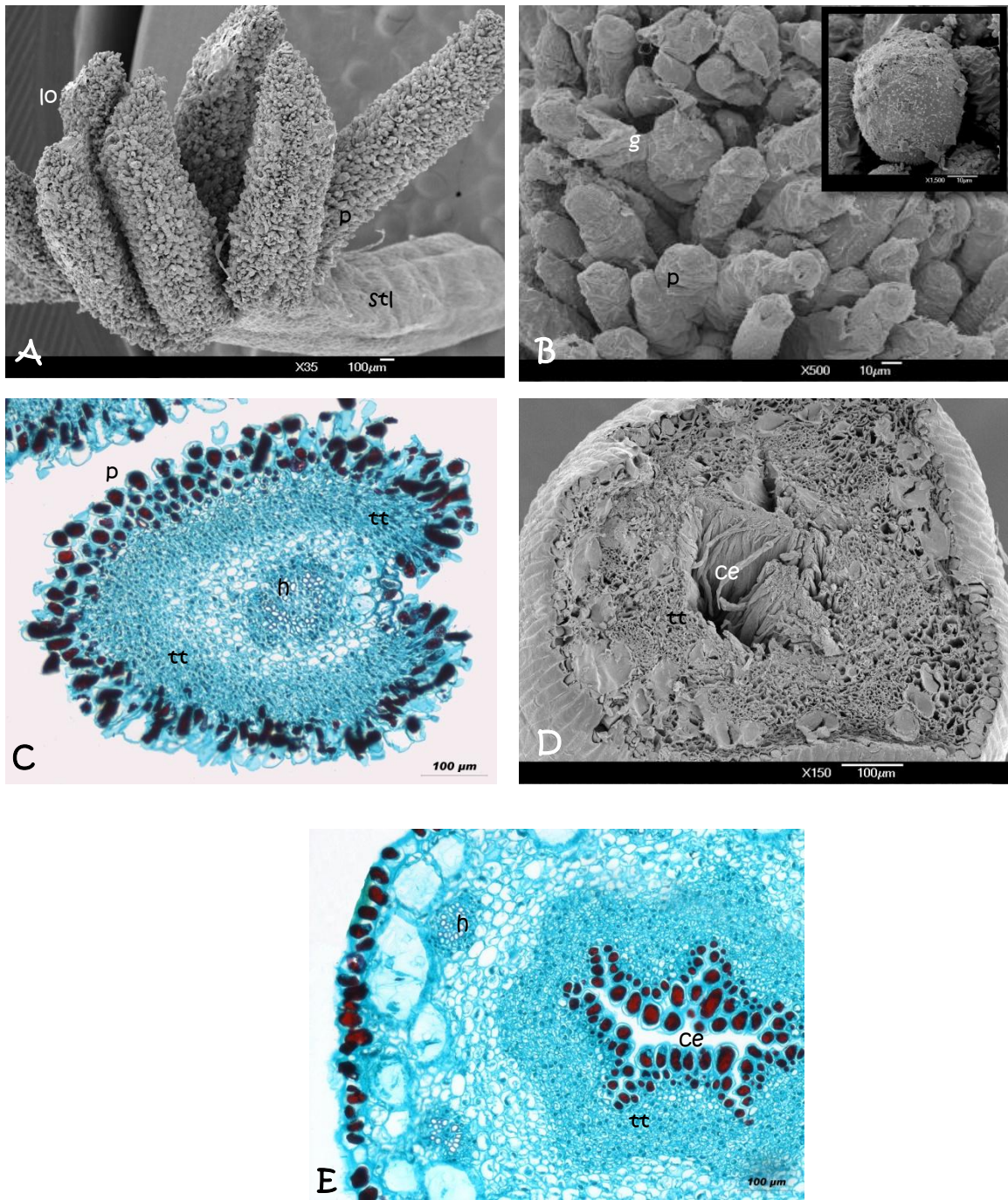
**Óvulo.** En los ovarios de las flores en etapa 6, se observan numerosos óvulos maduros que son anátropos, bitégmicos, crasinucelados y rodeados por el funículo, en los cuales ya se encuentra desarrollado el saco embrionario (Fig. 15A, B). En etapas maduras los óvulos se arreglan en racimos y se observan tricomas en la epidermis de los funículos, del lado en que se curva el óvulo, aunque menos abundantes y de menor longitud respecto a los observados en los funículos de las flores femeninas (Fig. 15C, D).



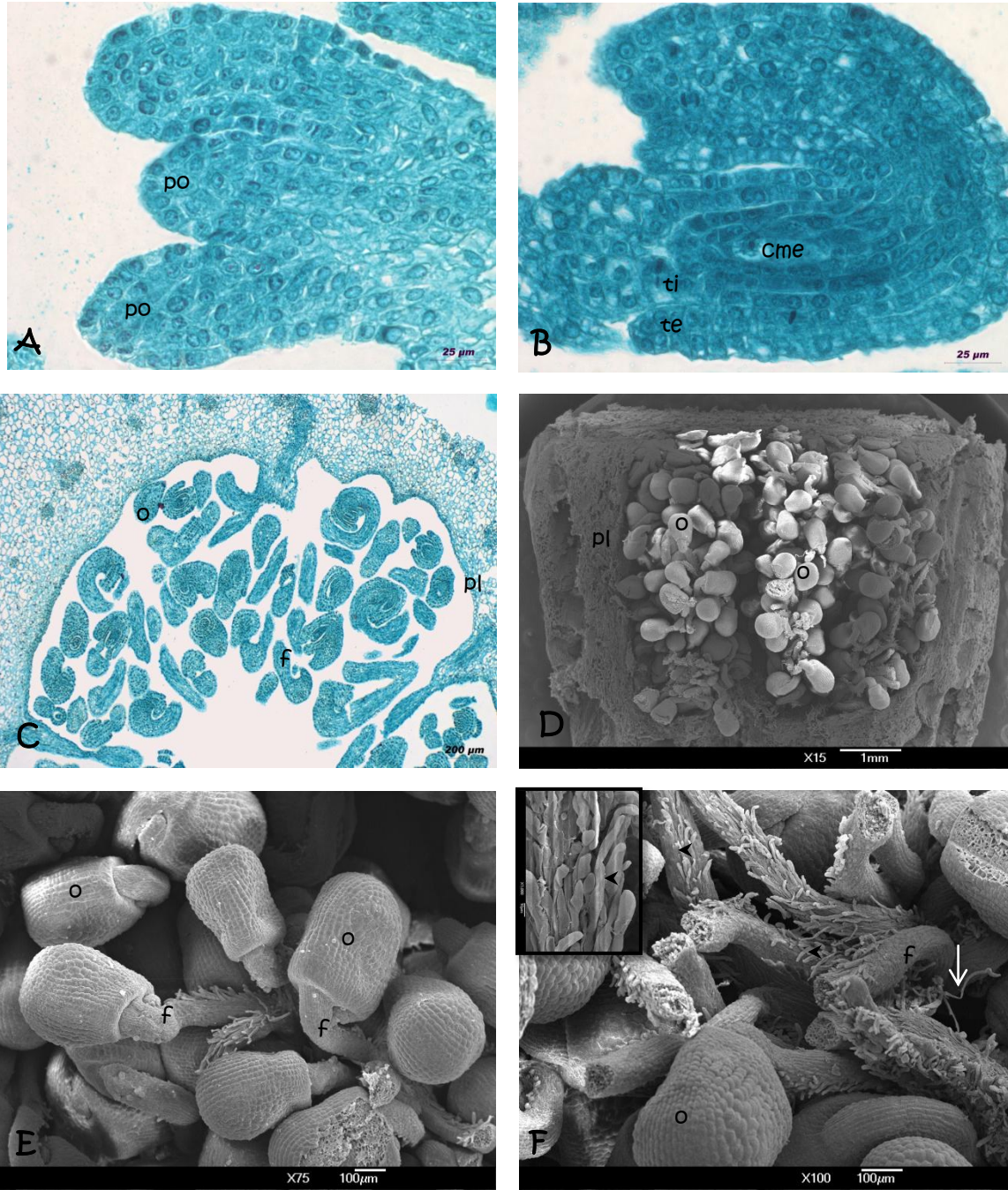
**Fig. 10.** Desarrollo del androceo en las flores funcionalmente masculinas de *E. polyacanthus*. **A.** Corte transversal de la antera, se observan cuatro microsporangios, dentro de ellos se encuentran células madre de la microspora (Etapa 3). **B.** Acercamiento a un microsporangio, se observa la pared de la antera con cuatro capas celulares, la epidermis, el endotecio, capa media, seguido por el tapete y células madres de las microsporas (Etapa 3). **C.** Corte transversal de una antera madura, dentro de los microsporangios se encuentran granos de polen (Etapa 6). **D.** Acercamiento de un microsporangio, se observan granos de polen uninucleados y la pared de la antera sólo mantiene la epidermis y el endotecio (Etapa 6). **c**, conectivo; **cm**, capa media; **cmi**, célula madre de la microspora; **cv**, célula vegetativa; **en**, endotecio; **ep**, epidermis; **g**, grano de polen; **m**, microsporangio; **t**, tapete.



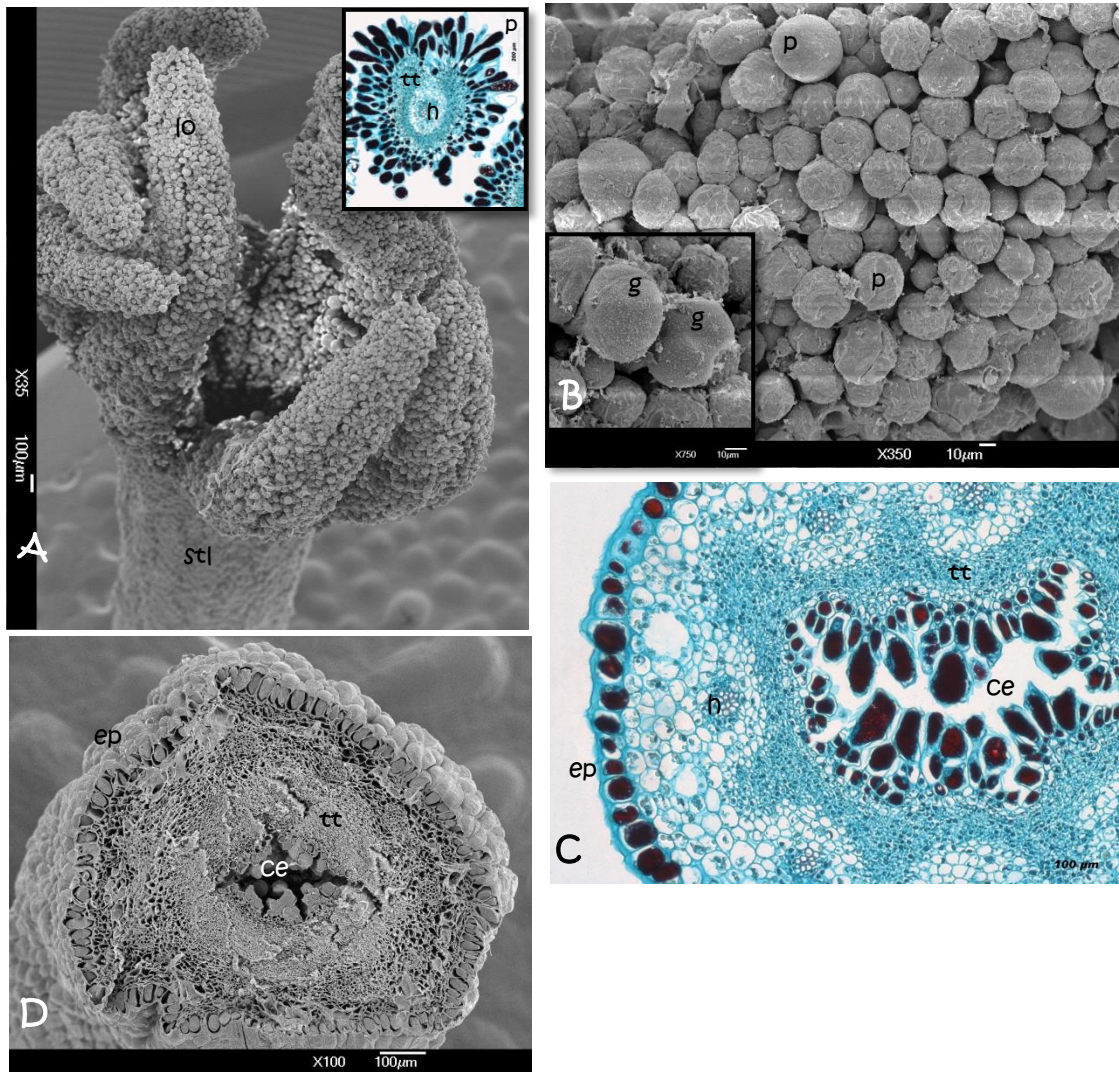
**Fig. 11.** Desarrollo del androceo en las flores funcionalmente femeninas de *E. polyacanthus* **A.** Corte transversal de la antera en etapa de célula madre de la microspora, se observan cuatro microsporangios (etapa tres). **B.** Acercamiento de un microsporangio en el que se observan cuatro capas de antera epidermis, endoteco, capa media, el tapete colapsado y células madres de las microsporas. **C.** Corte transversal de la antera, los microsporangios se encuentran completamente colapsados (Etapa 5) **D.** Acercamiento al microsporangio, se observan colapsadas tanto las células de la pared de la antera como las células madre de las microsporas y el tapete, se mantiene la epidermis y el endoteco con engrosamientos (Etapa 5) **E.** panorámica de las anteras en etapa de antesis. **F.** acercamiento a la antera, la flecha indica el adelgazamiento en la zona de unión entre el filamento y la antera. **a**, antera; **cm**, capa media; **cmi**, célula madre de la microspora; **en**, endoteco; **ep**, epidermis; **fi**, filamento; **m**, microsporangio; **t**, tapete.



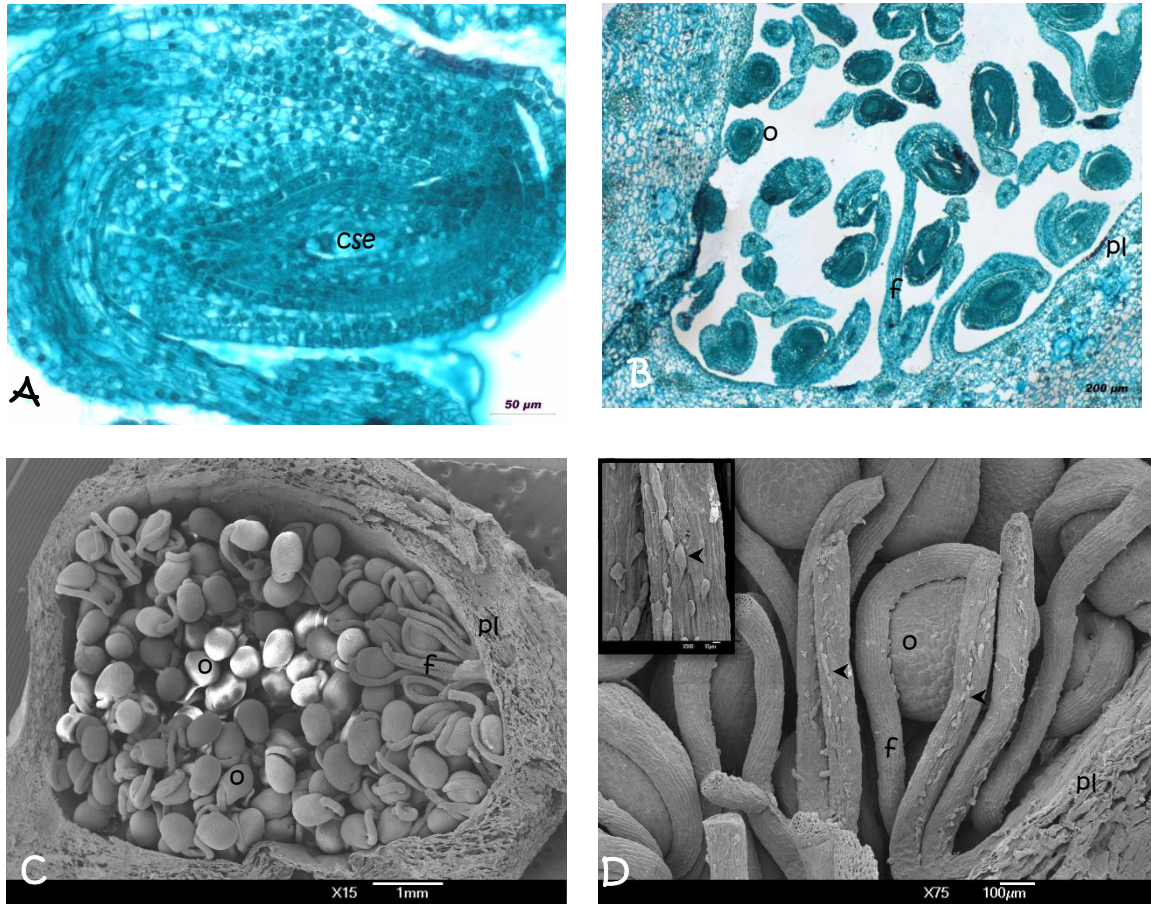
**Fig. 12.** Características morfológicas del gineceo de las flores funcionalmente femeninas de *E. polyacanthus* **A.** Vista panorámica del estigma. **B.** Acercamiento a las papilas estigmáticas, en el recuadro se muestra un grano de polen adherido a las papilas **C.** Corte transversal de lóbulos estigmáticos, se observan las papilas, el tejido de transmisión y el haz vascular. **D.** Fotomicrografía del estilo y canal estilar. **E.** Corte transversal de un estilo, en el centro se observa el canal estilar, la epidermis interna con taninos; el tejido de transmisión, córtex y epidermis externa con taninos. **ce**, canal estilar; **g**, grano de polen; **h**, haz vascular; **lo**, lóbulo estigmático; **p**, papilas; **stl**, estilo; **tt**, tejido de transmisión.



**Lámina 13.** Desarrollo de los óvulos de las flores funcionalmente femeninas de *Echinocereus polyacanthus* **A.** Se observan tres primordios ovulares en la cavidad del ovario (Etapa 1). **B.** Óvulo en etapa de célula madre de la megaspóra (Etapa 3). **C.** Corte transversal de un ovario, se observan numerosos óvulos. **D.** Fotomicrografía panorámica del ovario. **E.** Acercamiento a los óvulos. **F.** Acercamiento a los funículos se observan numerosos tricomas en su epidermis ventral (puntas de flecha) en el recuadro se muestra un acercamiento a los tricomas; en esta área se observaron algunos tubos polínicos (flecha). **cme**, célula madre de la megaspóra; **f**, funículo; **o**, óvulo; **pl**, placenta; **po**, primordio ovular; **te**, tegumento externo; **ti**, tegumento interno.



**Lámina 14.** Características morfológicas del gineceo de las flores funcionalmente masculinas de *E. polyacanthus* **A.** Vista panorámica del estigma, en el recuadro se observa el corte transversal de un lóbulo estigmático. **B.** Acercamiento a las papilas estigmáticas, en el recuadro se muestran granos de polen encontrados en las papilas. **C.** Corte transversal de un estilo, en el centro se observa el canal estilar, las papilas que lo forman, el tejido de transmisión, haces vasculares, células del córtex y la epidermis externa. **D.** Fotomicrografía del estilo y canal estilar. **ce**, canal estilar; **ep**, epidermis; **g**, grano de polen; **h**, haz vascular; **lo**, lóbulo estigmático; **p**, papilas; **stl**, estilo; **tt**, tejido de transmisión.



**Fig. 15.** Desarrollo de los óvulos de las flores funcionalmente masculinas de *Echinocereus polyacanthus* **A.** Ovulo anátropo con células del saco embrionario (Etapa 6). **B.** Corte transversal de un ovario, se observan numerosos óvulos. **C.** Panorámica del ovario, se observan los óvulos arreglados en racimos. **D.** Acercamiento a los funículos donde se observan tricomas en su cara interna (puntas de flecha) en el recuadro se muestra un acercamiento a los tricomas. **cse**, células del saco embrionario, **f**, funículo, **o**, óvulo **pl**, placenta.

## **TRAYECTORIA Y CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS POR EL PISTILO**

Con el objetivo de conocer si los estilos de ambos morfos florales de *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* son funcionales y permiten el crecimiento de los tubos polínicos, se analizó el crecimiento de tubos polínicos en los estilos. Los estigmas de flores masculinas y femeninas en etapas de post-antesis fueron polinizados manualmente con polen proveniente de otras flores masculinas.

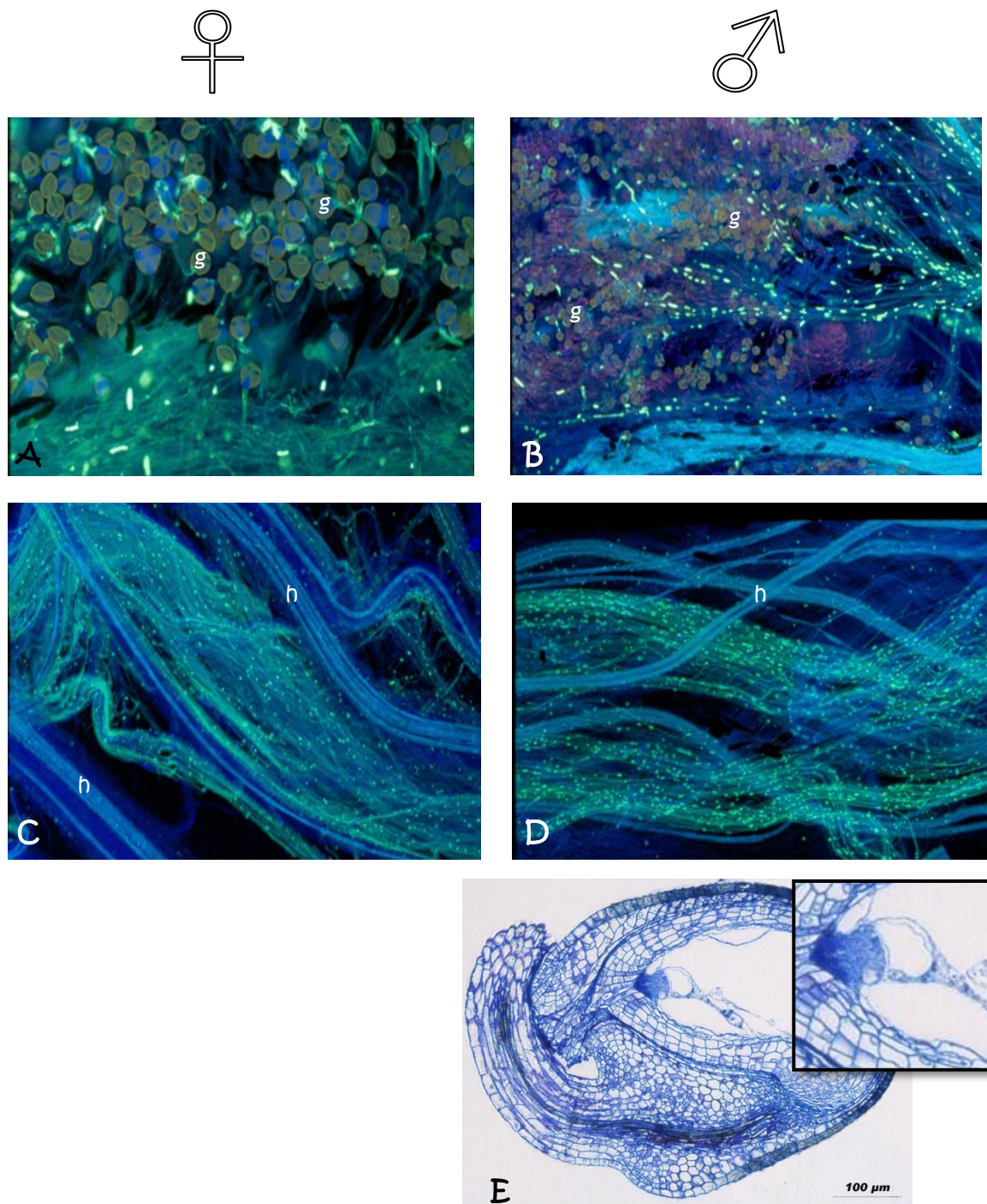
### ***Echinocereus coccineus***

En los estigmas tanto de las flores femeninas como masculinas se observaron granos de polen germinando (Fig. 16A, B). En los estilos de ambos morfos se observaron numerosos tubos polínicos, sin embargo existe diferencia en el patrón de crecimiento entre ellos, ya que los tubos polínicos se encontraron creciendo siempre en mayor número en los estilos de las flores funcionalmente femeninas (Fig. 16C, D). Esto no impidió que se llevara a cabo la fecundación, ya que en ovarios de flores masculinas se observaron semillas en desarrollo, conteniendo cigotos aparentemente normales (Fig. 16E).

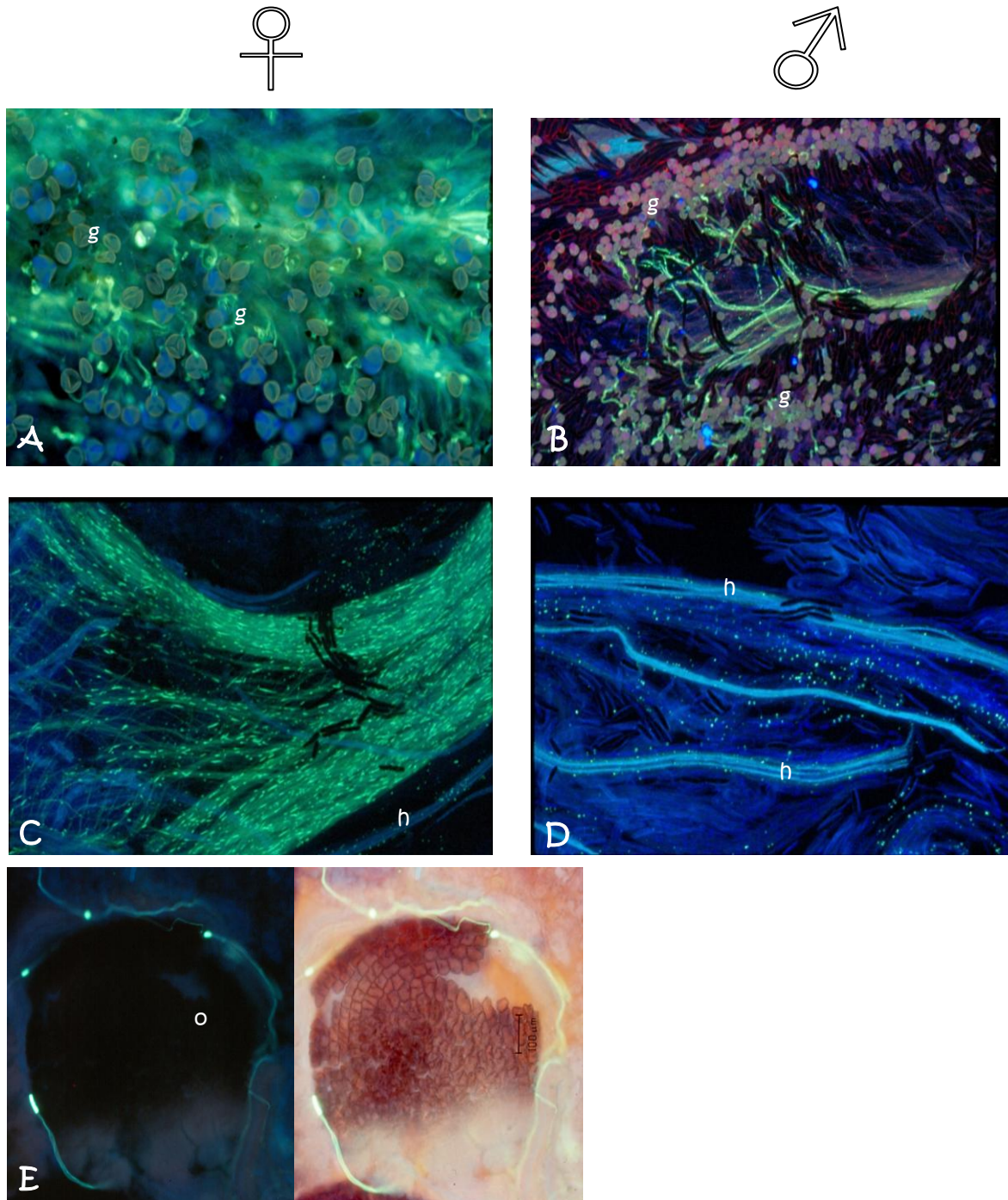
### ***Echinocereus polyacanthus***

Al igual que en *E. coccineus*, se observaron granos de polen germinando en estigmas tanto de las flores femeninas como masculinas (Fig. 16A, B), sin embargo, se determinó que los estilos de las flores masculinas no son funcionales ya que no se observaron tubos polínicos creciendo en la parte basal del estilo (Fig. 16C, D) por lo que en estas flores no se lleva a cabo la fecundación. Por el contrario, en óvulos de flores femeninas se observaron tubos polínicos rodeando los óvulos y entrando al micrópilo (Fig. 16E).





**Fig. 16.** Fotografía en microscopía de fluorescencia de estigmas y estilos de flores funcionalmente masculinas y funcionalmente femeninas de *E. coccineus*. **A, B.** Se muestran granos de polen germinando en los estigmas de flores femeninas y masculinas respectivamente (10X, 25X). **C, D.** Fotografías de estilos de flores femeninas y masculinas respectivamente, se observan numerosos tubos polínicos que crecen a través del estilo (10X). **E.** Se observa un óvulo de flor masculina, donde ya se ha formado el cigoto (recuadro). El crecimiento de los tubos polínicos se evidencia mediante la tinción verde fluorescente de tapones de calosa que éstos dejan tras su crecimiento. **g**, granos de polen; **h**, haz vascular.



**Fig. 17.** Fotografía en microscopía de fluorescencia de estigmas y estilos de flores funcionalmente masculinas y funcionalmente femeninas de *E. polyacanthus*. **A, B.** Se muestran granos de polen germinando en los estigmas de flores femeninas y masculinas respectivamente (25X, 10X). **C,** Fotografía de un estilo de flor femenina, se observan numerosos tubos polínicos (10X). **D.** Fotografía de la base del estilo de flor masculina, únicamente se observan los haces vasculares autofluorescentes y no hay tubos polínicos (10X). **E.** Se muestra un óvulo rodeado por un tubo polínico (25X). El crecimiento de los tubos polínicos se evidencia mediante la tinción verde fluorescente de tapones de calosa que éstos dejan tras su crecimiento. **g,** granos de polen; **h,** haz vascular; **o,** óvulo.

## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CARACTERES

Para conocer las diferencias morfológicas entre los dos morfos florales, se analizaron algunos caracteres de flores en anthesis, obteniendo los siguientes resultados:

### *Echinocereus coccineus*

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la longitud de estambres y anteras, siendo más grandes en las flores funcionalmente masculinas. Estos dos caracteres son los que a simple vista, nos permiten diferenciar los dos morfos florales y en este caso el tamaño está relacionado con la funcionalidad, asimismo las flores masculinas presentan estigmas más largos en comparación con los femeninos. Se encontró que el número de lóbulos estigmáticos y número de óvulos es mayor en las flores funcionalmente femeninas (Tabla 2), esto, sin embargo, no afecta la funcionalidad de los estigmas y óvulos en los dos morfos florales (Fig.16).

### *Echinocereus polyacanthus*

Al igual que en *E. coccineus* se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la longitud de estambres y anteras, siendo más grandes en las flores funcionalmente masculinas, corroborando la idea de que tamaño está relacionado con la funcionalidad. Asimismo se encontró que la longitud del estilo es mayor en las flores funcionalmente masculinas. En el resto de los caracteres del gineceo no se encontraron diferencias entre los morfos, lo que indica que en esta especie la funcionalidad del gineceo no está relacionada con el tamaño (Tabla 3).

Para conocer las diferencias morfológicas entre las dos especies se compararon los diferentes caracteres de cada morfo floral entre especies, encontrando que las flores masculinas de *Echinocereus coccineus* presentan estigmas más grandes, mayor cantidad de anteras y ovarios más largos respecto a las flores masculinas de *E. polyacanthus* (Tabla 4). Las flores femeninas de *E. coccineus* presentan anteras y estigmas más grandes y mayor cantidad de lóbulos estigmáticos y anteras que las flores femeninas de *E. polyacanthus* y las flores masculinas de ésta presentan estilos más largos que los de las flores femeninas de *E. coccineus* (Tabla 5).

**Tabla 2.** Se muestran los valores de los diferentes caracteres morfológicos medidos, en *E. coccineus* se compararon las medias de cada uno, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las flores funcionalmente masculinas y funcionalmente femeninas entre la longitud de estambres, el tamaño de las anteras, la longitud del estilo y el número de óvulos y lóbulos estigmáticos.

	Longitud estambres (mm)	Longitud anteras (mm)	Longitud de estilo (mm)	Longitud de estigma (mm)	# de lóbulos del estigma	# de anteras	# de óvulos	Longitud de ovario (mm)	Ancho de ovario (mm)
<b>MASCULINO</b>	25.55±4.7	1.89±0.3	30.67±3.6	5.43±0.8	8.33±1	532.67±164.8	694.67±100.5	9.17±1.9	6.02±1.7
<b>FEMENINO</b>	13.89±0.6	0.95±0.04	22.49±1.5	5.86±0.3	9.67±0.5	435.50±74.9	1158.50±326.1	7.65±1	5.97±1.7
<b>VALOR P</b>	0.001	0.000	0.000	0.258	0.017	0.218	0.008	0.119	0.958
<b>n</b>	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>DIFERENCIAS</b>	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO

**Tabla 3.** Se muestran los valores de los diferentes caracteres morfológicos medidos, en *E. polyacanthus* se compararon las medias de cada uno, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las flores funcionalmente masculinas y funcionalmente femeninas únicamente entre la longitud de estambres, el tamaño de las anteras y la longitud del estilo.

	Longitud estambres (mm)	Longitud anteras (mm)	Longitud de estilo (mm)	Longitud de estigma (mm)	# de lóbulos del estigma	# de anteras	# de óvulos	Longitud de ovario (mm)	Ancho de ovario (mm)
<b>MASCULINO</b>	22.946±2.5	1.98±0.2	28.663±3.3	3.584±0.7	7.6±0.8	247.4±46.5	772.6±260.6	6.759±2.2	5.113±1.1
<b>FEMENINO</b>	16.467±3	0.878±0.3	24.814±2.3	4.137±0.7	7.5±1.4	246.3±48.7	957.2±219.8	6.898±1.6	5.206±1
<b>VALOR P</b>	0.00005	0.00000	0.00760	0.0960	0.8513	0.9594	0.1041	0.8739	0.8472
<b>n</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>DIFERENCIAS</b>	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO

**Tabla 4.** Se muestran los valores de los diferentes caracteres morfológicos medidos, en las flores masculinas de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* se compararon las medias de cada uno, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las flores únicamente en la longitud del estigma y del ovario y el número de anteras.

FLORES MASCULINAS	Longitud estambres (mm)	Longitud anteras (mm)	Longitud de estilo (mm)	Longitud de estigma (mm)	# de lóbulos del estigma	# de anteras	# de óvulos	Longitud de ovario (mm)	Ancho de ovario (mm)
<i>E. coccineus</i>	25.552±4.7	1.885±0.3	30.673±3.6	5.427±0.8	8.333±1	532.667±164.8	694.667±100.5	9.167±2	6.023±1.7
<i>E. polyacanthus</i>	22.946±2.5	1.98±0.2	28.663±3.3	3.584±0.7	7.6±0.8	247.4±46.5	772.6±260.6	6.759±2.2	5.11±1.1
<b>VALOR P</b>	0.162	0.501	0.273	0.000	0.143	0.000	0.499	0.046	0.217
<b>n</b>	16	16	16	16	16	16	16	16	16
<b>DIFERENCIAS</b>	NO	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO

**Tabla 5.** Se muestran los valores de los diferentes caracteres morfológicos medidos, en las flores femeninas de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* se compararon las medias de cada uno, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las flores únicamente en la longitud de anteras, estilo, estigma y número de lóbulos estigmáticos y anteras.

FLORES FEMENINAS	Longitud estambres (mm)	Longitud anteras (mm)	Longitud de estilo (mm)	Longitud de estigma (mm)	# de lóbulos del estigma	# de anteras	# de óvulos	Longitud de ovario (mm)	Ancho de ovario (mm)
<i>E. coccineus</i>	13.892±0.6	0.952±0.04	22.485±1.5	5.857±0.3	9.667±0.5	435.500±75	1158.500±326	7.648±1	5.970±1.7
<i>E. polyacanthus</i>	16.467±3	0.878±0.3	24.814±2.3	4.137±0.7	7.5±1.4	246.3±48.7	957.2±220	6.898±1.6	5.206±1
<b>VALOR P</b>	0.060	0.000	0.045	0.000	0.003	0.000	0.160	0.317	0.273
<b>n</b>	16	16	16	16	16	16	16	16	16
<b>DIFERENCIAS</b>	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO

## DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Mediante la técnica (tinción) de TUNEL se buscó determinar si existen evidencias de MCP, es decir núcleos con DNA fragmentado, en el gineceo y androceo de las flores funcionalmente femeninas y funcionalmente masculinas. Se observaron los núcleos de las células de estigmas, estilos, ovarios, óvulos y anteras. 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 el control positivo, previamente a la reacción de TUNEL se agregó DNasa al corte de tejido, la cual fragmenta el DNA y nos da una referencia de lo que se quiere observar, es decir, núcleos con la tinción doble (Fig. 18). Al control negativo no se le agregó la enzima TdT (Terminal deoxinucleotidil-transferasa), que es la encargada de unir los nucleótidos y el fluorocromo a los núcleos, por lo que no se observa la fluorescencia en los núcleos (Fig. 19).

### *Echinocereus coccineus*

#### *Flores funcionalmente masculinas.*

**Gineceo.** En flores cerca de la anthesis se observaron núcleos con DNA fragmentado en estigmas y estilos, en las células del tejido de transmisión adyacentes a las papilas de los lóbulos estigmáticos y a las papilas del canal estilar respectivamente. Igualmente en algunas de las células del córtex (Fig. 20), sin embargo, no se observaron evidencias de MCP en ovario y óvulos, ni en los sacos embrionarios (Fig. 21).

**Androceo.** En las anteras de estas flores, no se observan evidencias de MCP, sólo hasta la etapa de en etapa de microsporas libres. Se observaron células con características de MCP en el tapete, lo que en esa etapa es parte del desarrollo normal de los granos de polen (Fig. 22).

*Flores funcionalmente femeninas.*

**Gineceo.** En etapa temprana las células de los estilos de estas flores, no se observan evidencias de MCP ni en el tejido de transmisión ni en las células del córtex. A medida que progresa la maduración y se acerca la antesis hay evidencias de MCP en algunos tejidos del estilo (Fig. 23), aunque en el estigma y ovario, no se observaron evidencias de MCP. (Fig. 24).

**Androceo.** En las anteras de las flores funcionalmente femeninas se observaron evidencias de MCP a partir de la etapa de cmmi, tanto en las células del tapete, como en las cmmi's. En las anteras de flores en antesis, se observan gran cantidad de núcleos con DNA fragmentado en todas las capas de la antera y en el interior del microsporangio, lo que puede ocasionar que ésta colapse en etapas posteriores. (Fig. 25).

***Echinocereus polyacanthus***

*Flores funcionalmente masculinas*

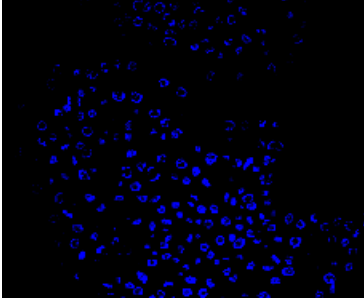
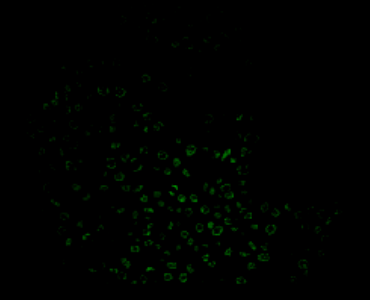
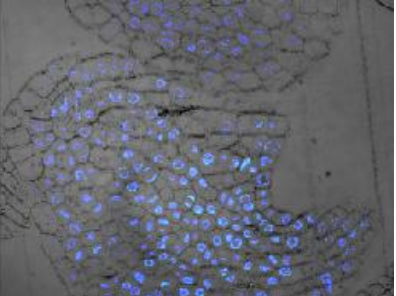
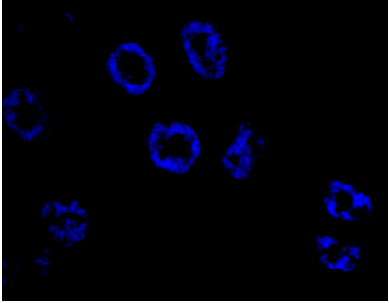
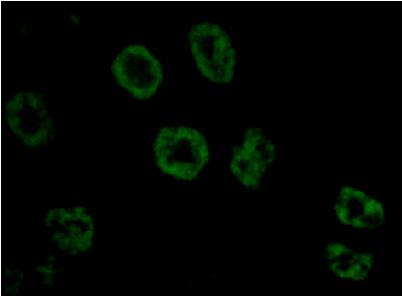
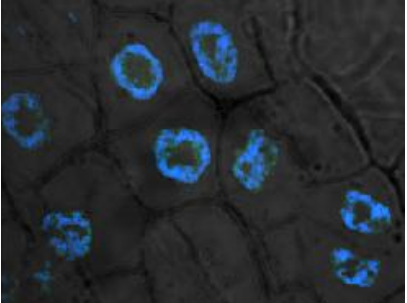
**Gineceo.** En flores cerca de la antesis, se encontraron evidencias de MCP en las células del tejido de transmisión del estilo, éstas son adyacentes a las papilas del canal estilar, que son autofluorescentes. También se observan núcleos con DNA fragmentado en algunas células del córtex (Fig. 26). Los ovarios de las flores funcionalmente masculinas en las etapas tempranas y avanzadas de desarrollo presentaron evidencias de MCP en los óvulos, tanto en el tejido del funículo como en la nucela. (Fig. 27).

**Androceo.** Se observaron evidencias de MCP en las anteras maduras, en algunas células de la epidermis y en los restos del tapete, en esta etapa se observan granos de polen jóvenes que son autofluorescentes (Fig. 27).

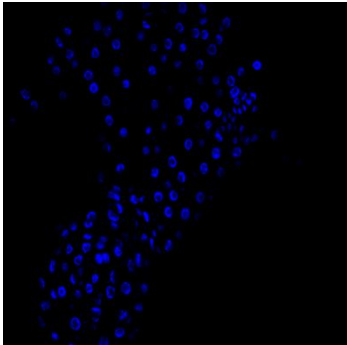
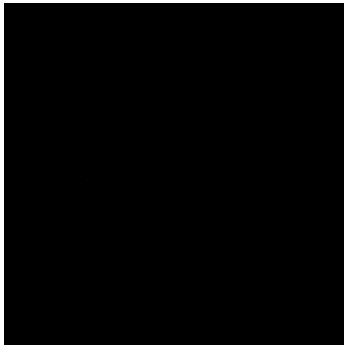
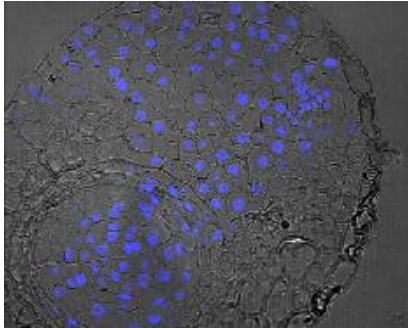
*Flores funcionalmente femeninas*

**Gineceo.** En el estilo hay evidencias de MCP, en etapas maduras. Mientras que en el estigma y ovario, no se observaron evidencias de MCP (Fig. 29).

**Androceo.** En estas flores, en etapa de célula madre de la microspora (cmmi) se observaron evidencias de MCP en la antera, en las células del tapete, lo que no es normal en esta etapa de desarrollo y lo que podría estar ocasionando que la antera se colapse en etapas posteriores. Asimismo, se observó MCP en las cmmi y en las capas exteriores de la antera (Fig. 28).

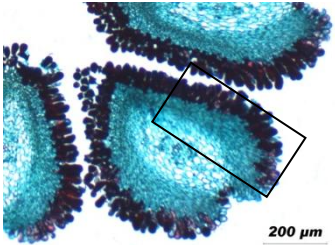
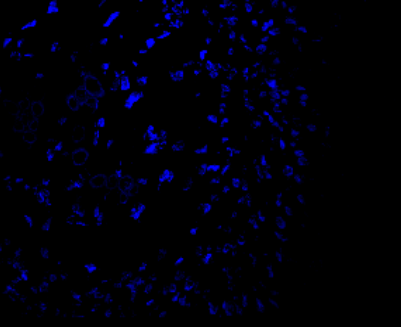
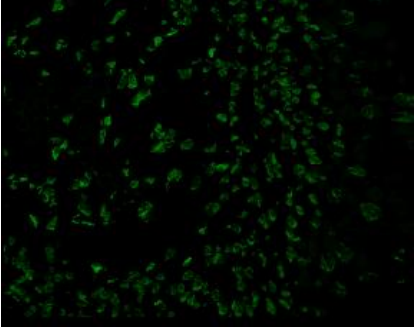
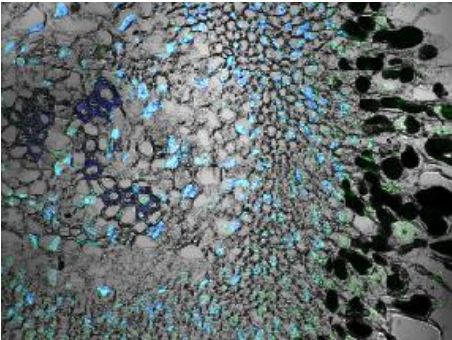
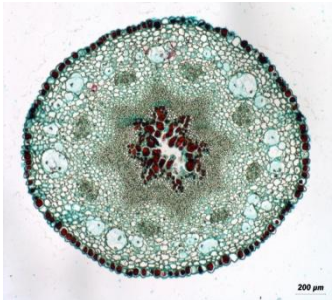
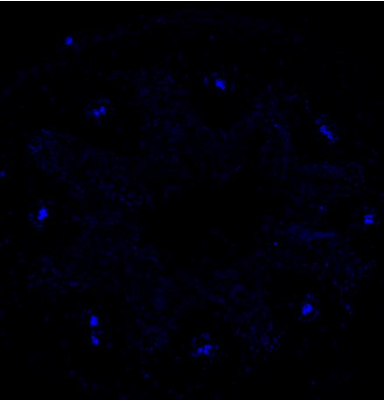
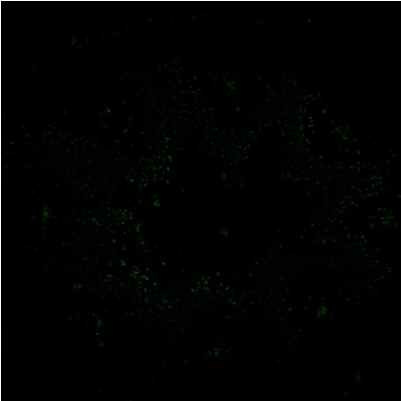
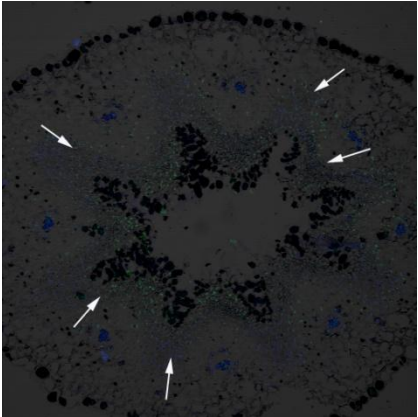
CONTROLES	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
Control positivo (40X)			
Control positivo (100X)			

**Fig. 18.** Control Positivo. A este tejido se le agrega DNasa, por lo que en la tinción de TUNEL se observan núcleos fluorescentes. La tinción de DAPI (azul) evidencia los núcleos. En las imágenes superpuestas se observan núcleos con DNA fragmentado.

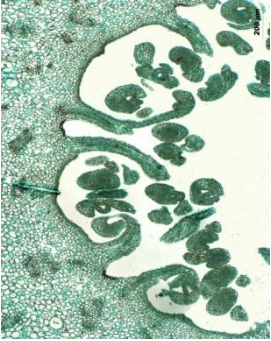
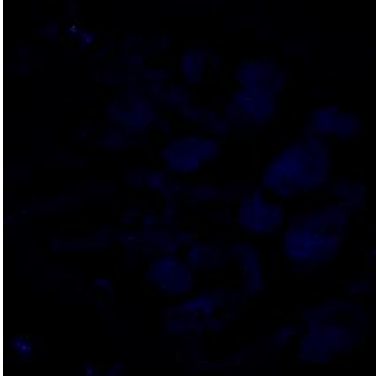
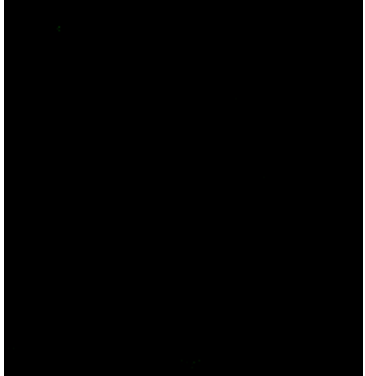
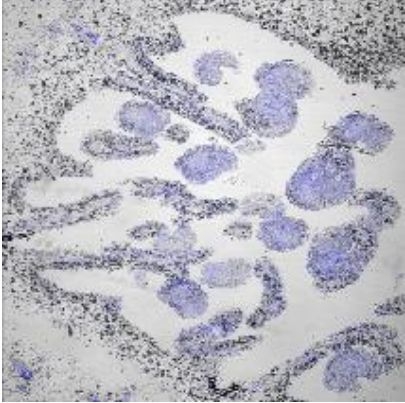
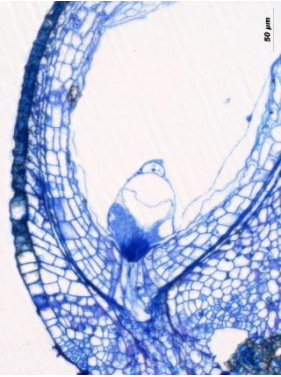
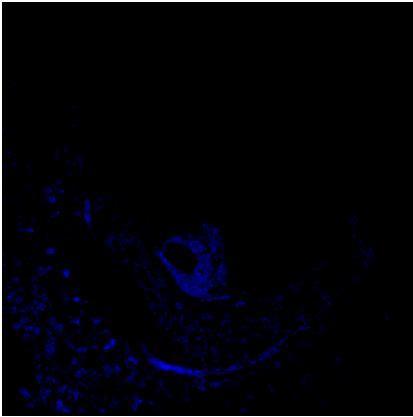

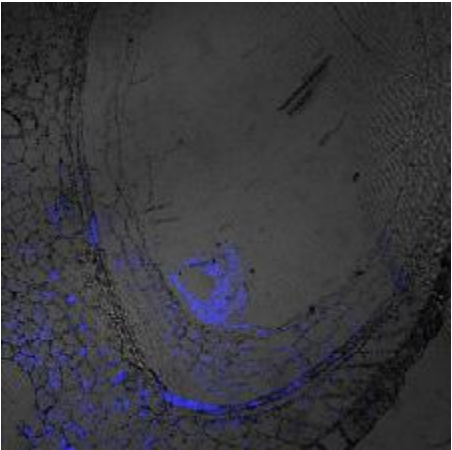
CONTROLES	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
Control negativo			

**Fig. 19.** 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


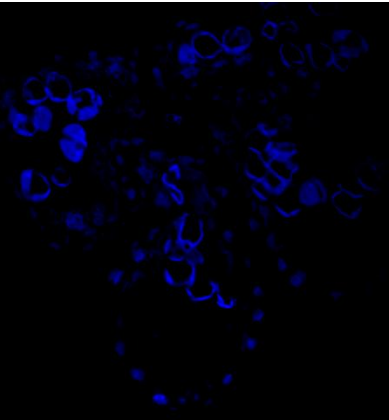
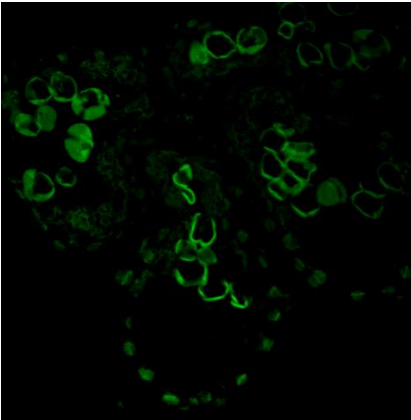
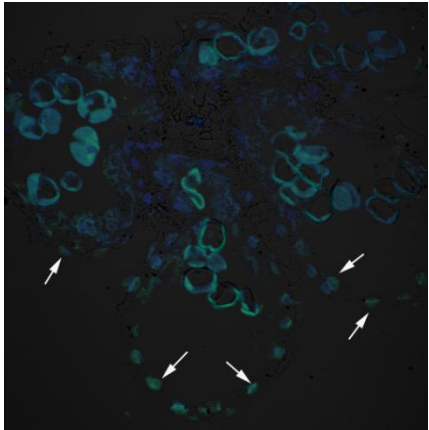


Flores funcionalmente masculinas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p><b>ESTIGMA</b></p> 			
<p><b>ESTILO</b></p> 			

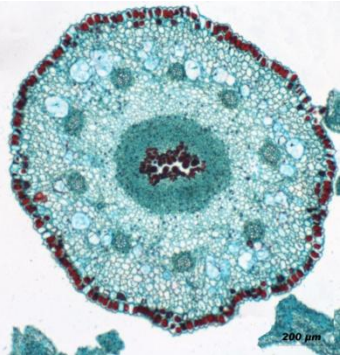
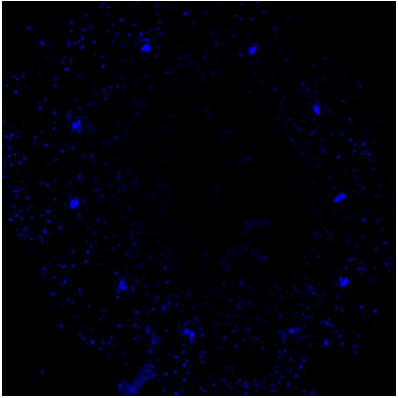
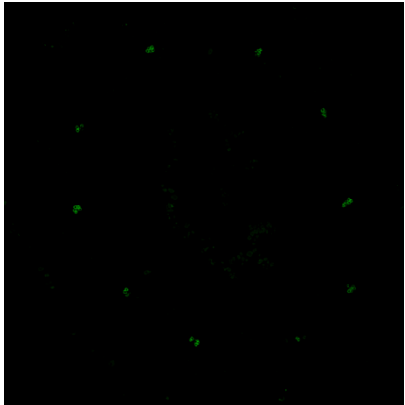
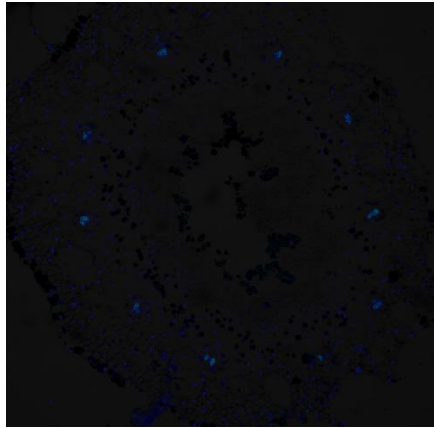
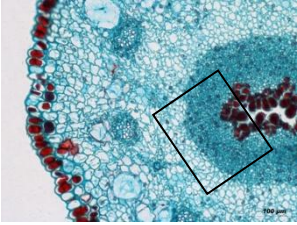
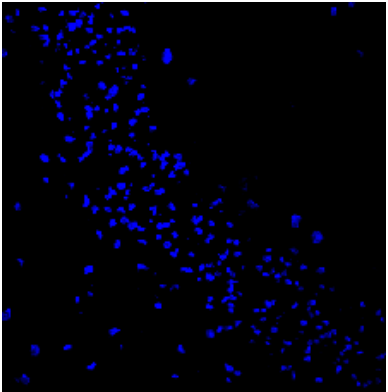
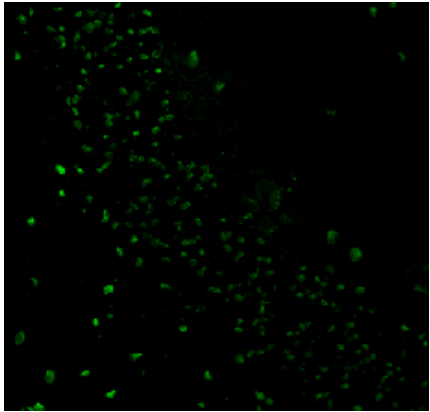
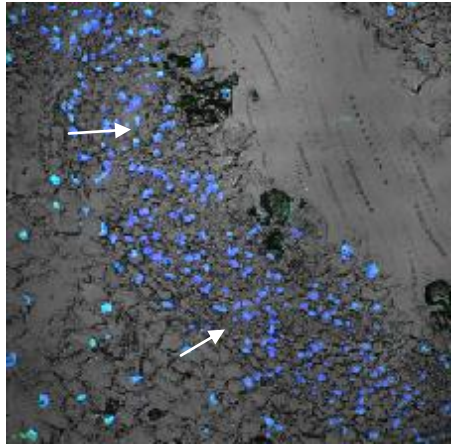
**Fig. 20.** Estigmas y estilos de flores funcionalmente masculinas de *Echinocereus coccineus* (etapa siete). El recuadro indica el sitio del estilo que se observa en las pruebas. En estos tejidos se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde) en las células del tejido de transmisión, la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

Flores Funcionalmente masculinas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p style="text-align: center;"><b>OVARIO</b></p> 			
<p style="text-align: center;"><b>ÓVULO</b></p> 			

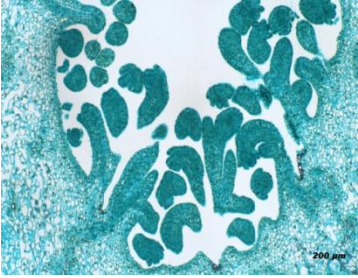
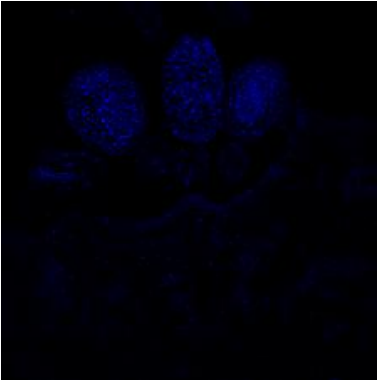
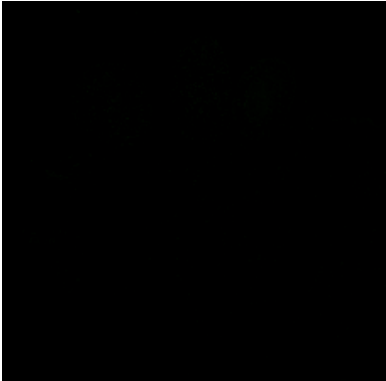
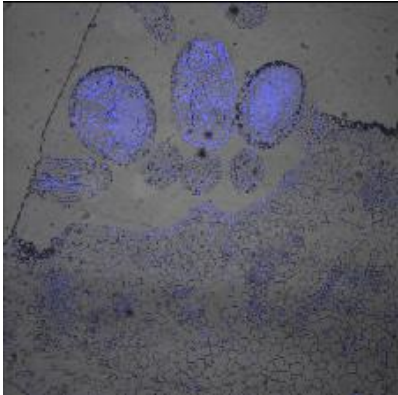
**Fig. 21.** Ovarios y óvulos de flores funcionalmente masculinas de *E. coccineus* (etapas siete y ocho). El recuadro indica el sitio del ovario que se observa en las pruebas. En este tejido no se observa en los núcleos la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido.

Flores Funcionalmente Masculinas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p style="text-align: center;"><b>ANTERAS</b></p> 			

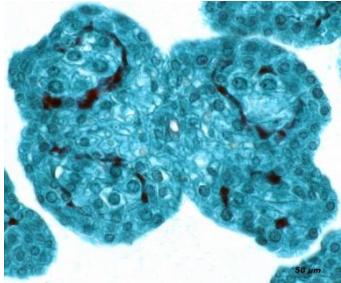
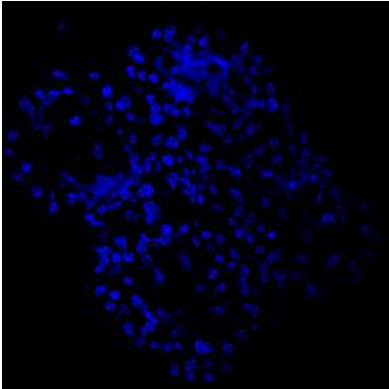
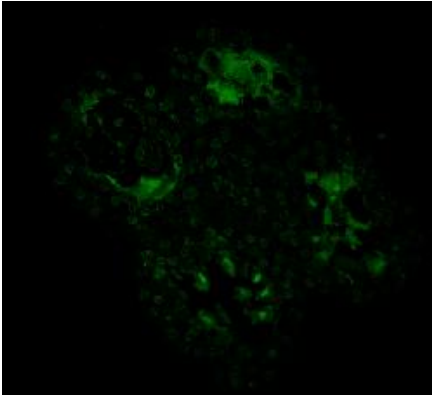
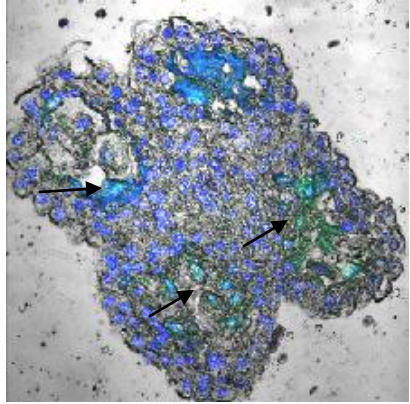
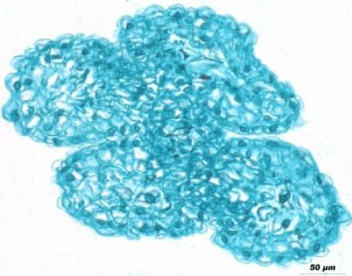
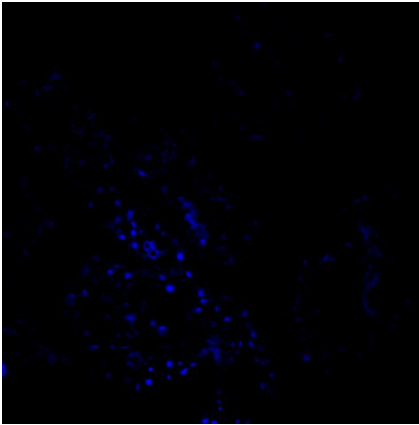
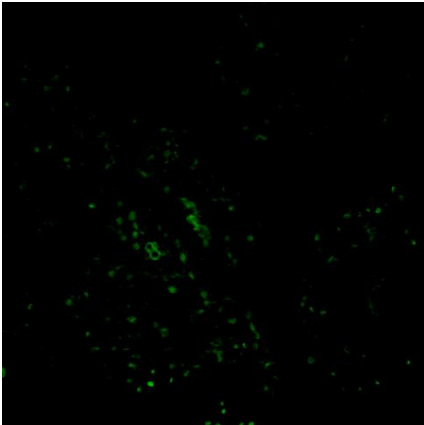
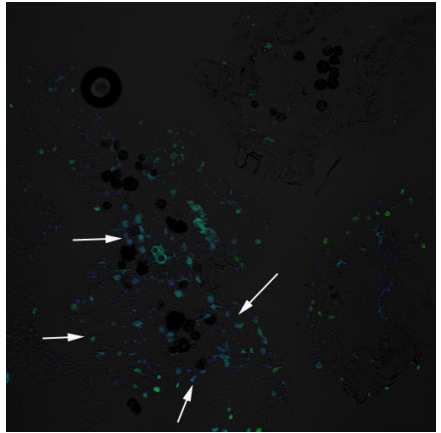
**Fig. 22.** Anteras de flores funcionalmente masculinas de *E. coccineus* (etapa seis). En este tejido se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde) en las células del tapete, la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

Flores Funcionalmente femeninas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes sobrepuestas
<p style="text-align: center;"><b>ESTILO</b></p> 			
<p style="text-align: center;"><b>ESTILO</b></p> 			


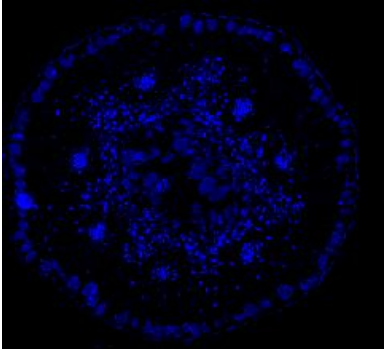
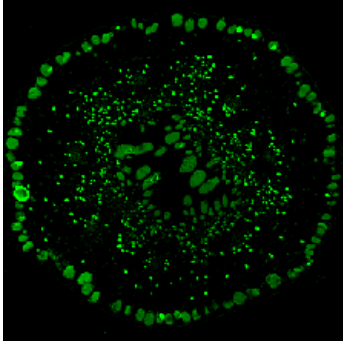
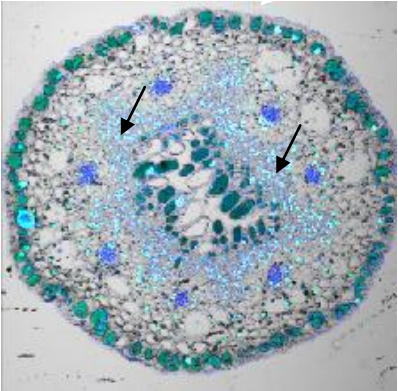
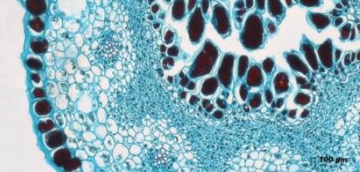
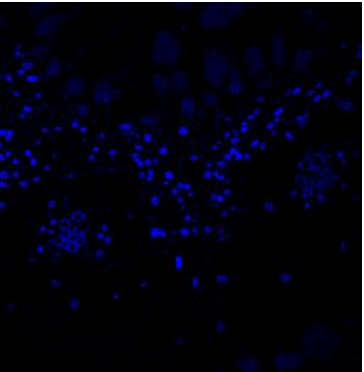
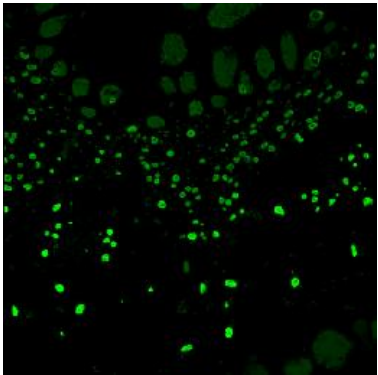
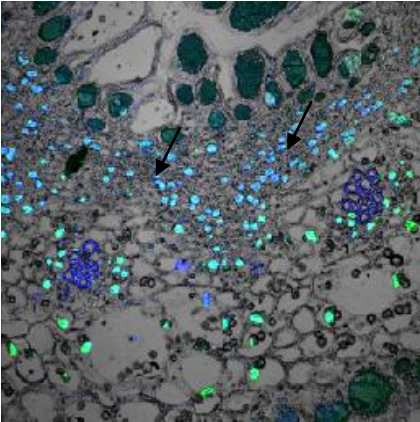
**Fig. 23.** Estilos de flores funcionalmente femeninas de *E. coccineus*. El recuadro indica el sitio del estilo que se observa en las pruebas. En estilos en etapas jóvenes (arriba) no se observan núcleos con la tinción de TUNEL (verde), sólo se observan en el tejido de transmisión de estilos maduros (abajo) (flechas). Se observan haces vasculares autofluorescentes, la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido. En las imágenes sobrepuestas se observan núcleos con tinción doble.

Flores Funcionalmente femeninas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p style="text-align: center;"><b>OVARIO</b></p> 			

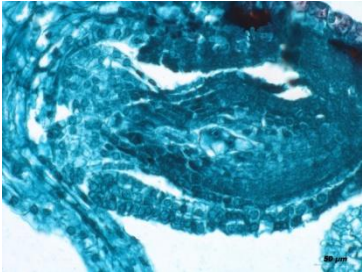
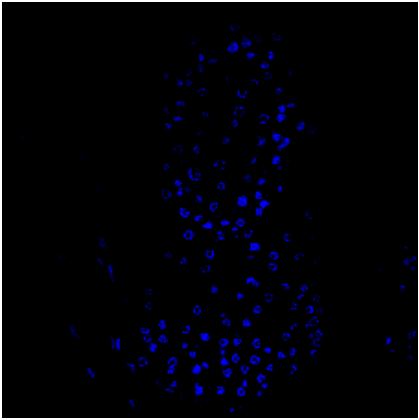
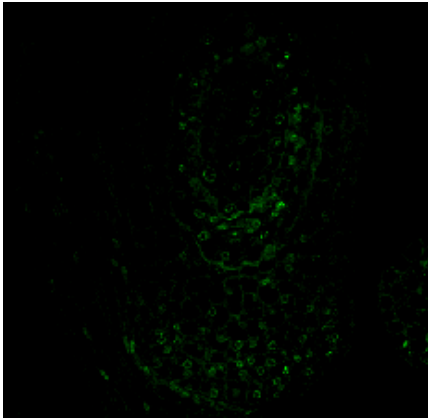
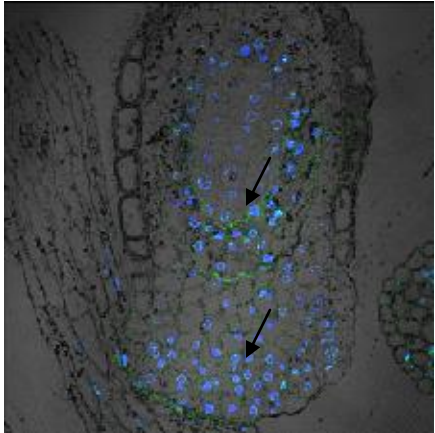

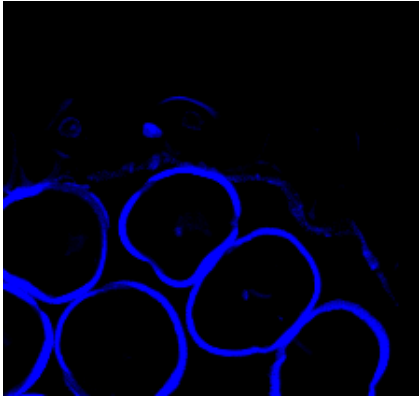
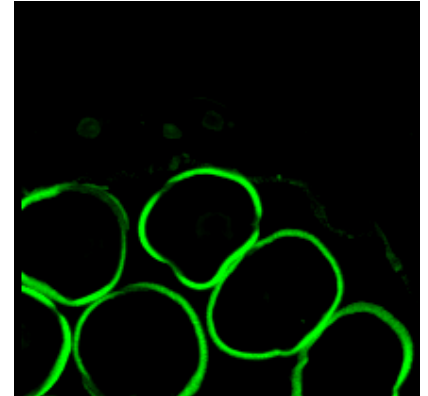
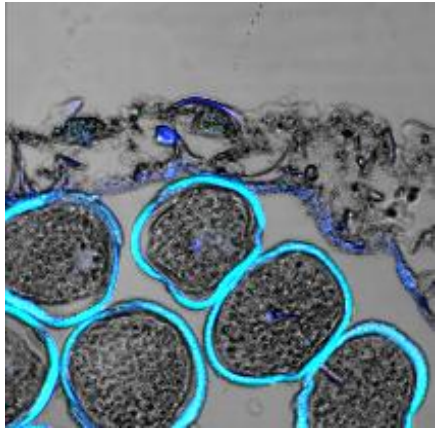
**Fig. 24.** Ovarios y óvulos de flores funcionalmente femeninas de *E. coccineus*. En este tejido se observa en algunos de los núcleos la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.

Flores Funcionalmente Femeninas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes sobrepuestas
<p><b>ANTERAS</b></p> 			
<p><b>ANTERAS</b></p> 			

**Lámina 25.** Anteras de flores funcionalmente femeninas de *E. coccineus*. Durante la etapa tres (arriba) en el tapete, la célula madre de la microspora y en todas las capas de la antera se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde). Para la etapa seis (abajo), la antera se encuentra totalmente colapsada y todas sus células presentan núcleos con DNA fragmentado (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes sobrepuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado.


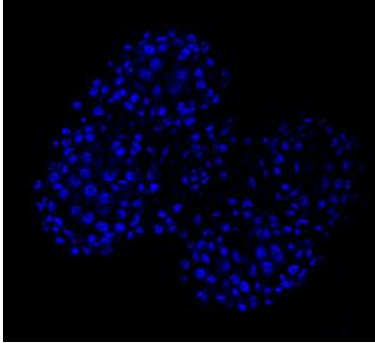
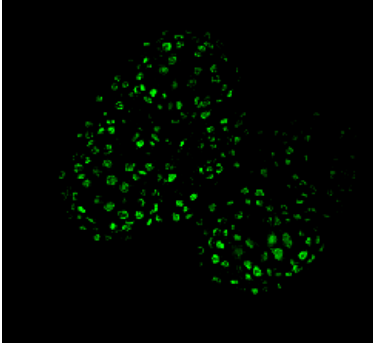
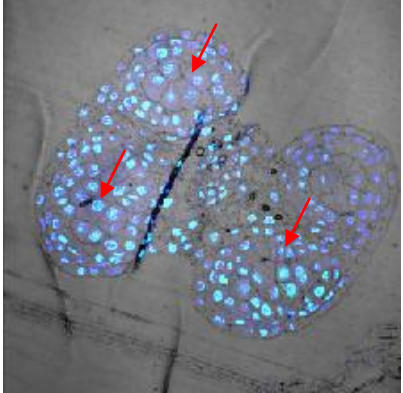
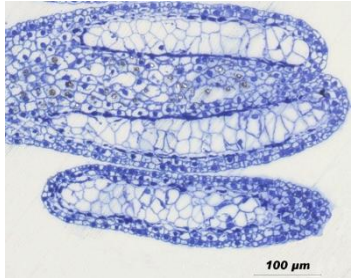
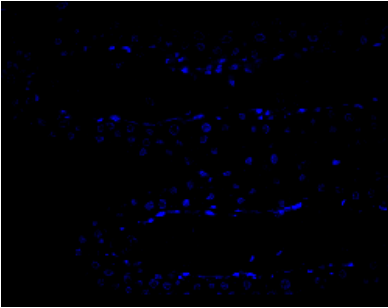
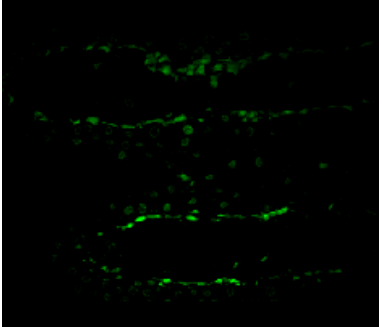
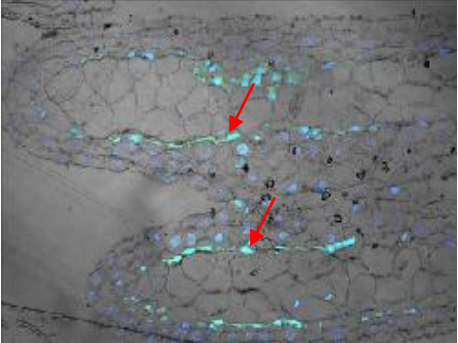
Flores Funcionalmente masculinas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p data-bbox="247 430 369 462"><b>ESTILO</b></p> 			
<p data-bbox="247 954 369 987"><b>ESTILO</b></p> 			

**Lámina 26.** Cortes de estilos de flores funcionalmente masculinas de *E. polyacanthus* (etapa siete). En el tejido de transmisión 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 con DNA fragmentado en el tejido de transmisión.

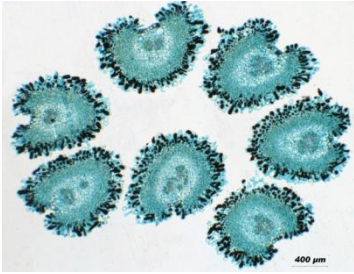
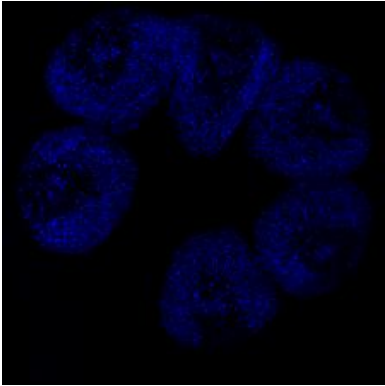
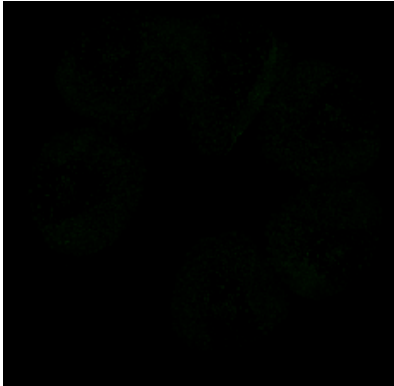
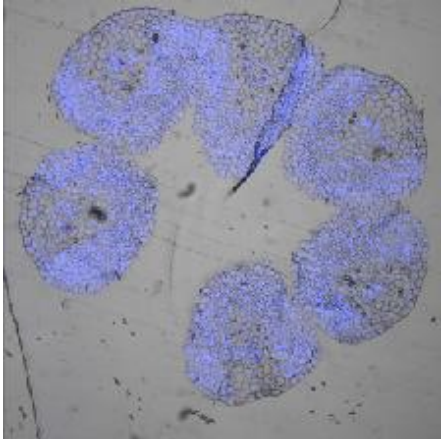
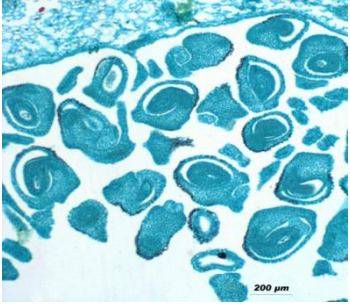
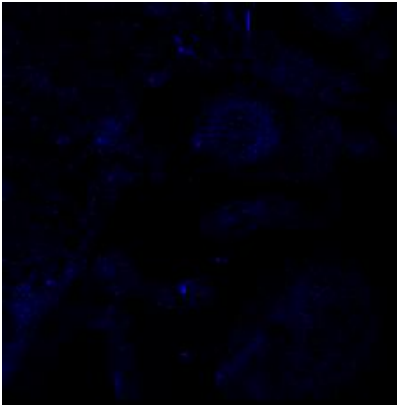
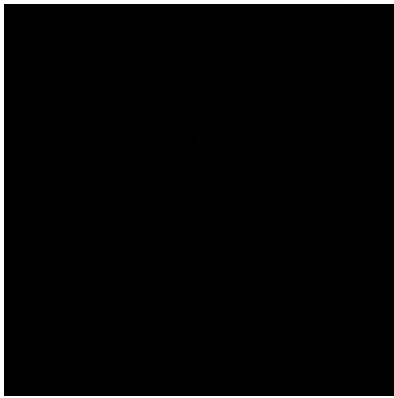
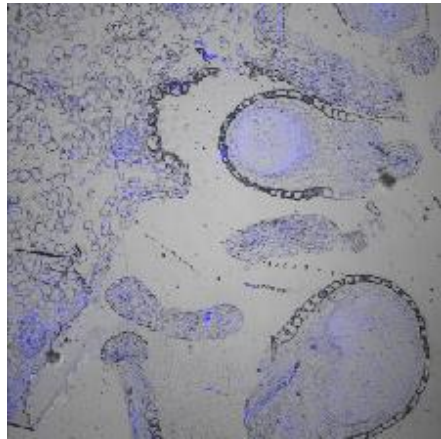
Flores Funcionalmente Masculinas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p style="text-align: center;"><b>ÓVULO</b></p> 			
<p style="text-align: center;"><b>ANTERA</b></p> 			

**Fig. 26.** Óvulo y microsporangio de flores funcionalmente masculinas de *E. polyacanthus*. En las células del funículo y la nucela (arriba) y en la epidermis y los restos del tapete (abajo), se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble.



Flores funcionalmente femeninas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p style="text-align: center;"><b>ANTERA</b></p> 			
<p style="text-align: center;"><b>ANTERA</b></p> 			

**Fig. 28.** Anteras de flores funcionalmente femeninas de *E. polyacanthus* (etapa tres). En las células del tapete, las células madre de las microsporas y las capas de la antera se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos. En las imágenes superpuestas las flechas indican los núcleos con tinción doble, es decir DNA fragmentado en las capas de la antera y el tapete. 64

Flores funcionalmente femeninas	Tinción de DAPI	Tinción de TUNEL	Imágenes superpuestas
<p><b>ESTIGMA</b></p> 			
<p><b>OVARIO</b></p> 			

**Fig. 29.** Estigma y ovario de flores funcionalmente femeninas de *E. polyacanthus* (Etapa siete). En estos tejidos no se observan núcleos fluorescentes con la tinción de TUNEL (verde), la tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos.

## DISCUSIÓN

*Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus* son cactáceas hermanas que se distribuyen en los matorrales del norte de México, presentan tallos pequeños, solitarios o ramificados, con flores tubulares de color rosa, naranjas a rojas. Las flores son dimórficas, es decir que presentan dos morfos sexuales, masculino y femenino (Hoffman, 1992; Anderson, 2001; Sánchez, 2010).

### Proporción de morfos florales

En la presente investigación y para ambas especies, se reconoció la presencia de dos morfos florales. El morfo funcionalmente masculino en el que las flores son estaminadas, es decir presentan androceo funcional pero no producen fruto. El funcionalmente femenino, en el que las flores son pistiladas, es decir, presentan gineceo funcional y producen semillas, pero el androceo es estéril. Asimismo, se determinó que la proporción de estos morfos en las poblaciones estudiadas es similar. Estas mismas proporciones son reportadas para poblaciones de *Echinocereus coccineus* en Nuevo México, E.U.A (Hoffman, 1992) y para poblaciones de *E. yavapaiensis* en Arizona, E.U.A. (Baker, 2006). Para poblaciones de *Consolea spinosissima* en Jamaica, se reporta una mayor incidencia de individuos masculinos (Strittmatter *et al.* 2002).

### Esterilidad masculina

Se encontró para ambas especies que en las flores funcionalmente femeninas, el androceo es estéril, el tamaño de los estambres se encuentra reducido, y el largo de las anteras es significativamente menor que el observado en las flores masculinas y éstas son de color amarillo claro. El desarrollo del grano de polen se detiene en etapa pre-meiótica, las células madres de las microsporas no continúan su desarrollo y las células del tapete se observan atrofiadas.

Esto también ocurre en otras especies de cactáceas que presentan unisexualidad, como *Opuntia stenopetala*, *Consolea spinosissima*, *C. millspaughii*, *C. moniliformis*, *C. nashii*, *C. picardeae*, *C. rubescens* y en *Echinocereus yavapaiensis*. En estas especies la aborción del androceo en las flores femeninas sucede en etapa de cmmi (Orozco, 2002;

Strittmatter, 2002; Flores, 2005; Baker, 2006; Strittmatter *et al.* 2006). En *O. robusta* la aborción sucede después de la meiosis cuando ya están formadas las tétradas de microsporas, en estas flores el androceo también está reducido en comparación con el de las flores masculinas (Silva, 2007; Alfaro 2008). En todas estas especies, excepto en *E. yavapaiensis* se ha demostrado que las células del tapete colapsan y se atrofian en etapas tempranas al igual que en *E. coccineus* y en *E. polyacanthus*.

De acuerdo con Papini *et al.* (1999) en las angiospermas las células del tapete atraviesan un proceso de muerte celular programada (MCP) en el que se condensa la cromatina y se desplaza a la periferia del núcleo, las células pierden las paredes celulares y plamodesmos, finalmente las células se colapsan. Este proceso es característico de los tapetes secretores y es crucial para la liberación de nutrientes para el desarrollo correcto de las microsporas. Varnier *et al.* 2005, plantean un modelo en el que la MCP se extiende radialmente, desde el tapete hacia el resto de las capas exteriores de la antera para facilitar la dehiscencia y una alteración en este patrón puede conducir a la esterilidad masculina.

En el androceo de las flores masculinas de *E. coccineus*, se observaron evidencias de MCP en las células del tapete en etapa de microsporas, lo cual también ocurre en otras especies estudiadas de Cactaceae (Flores, 2005; Alfaro, 2008). Para las flores masculinas de *E. polyacanthus* se observaron evidencias de MCP en las células de la epidermis de la antera en etapa de grano de polen. Ambos procesos como parte del desarrollo normal de la antera para la maduración apropiada de los granos de polen.

Así, las anteras de las flores funcionalmente masculinas de ambas especies tienen un tapete secretor funcional tanto en la etapa premeiótica y posmeiótica, producen una gran cantidad de granos de polen y éstos son los que le dan su coloración rosa en la antesis.

En las flores funcionalmente femeninas de *E. coccineus* y en *E. polyacanthus* las células del tapete se observan atrofiadas tempranamente en el desarrollo, mostrando evidencias de MCP, lo que podría ocasionar la muerte de las células madres de las microsporas; además las capas de la antera completa se colapsan en etapas posteriores. Las evidencias de MCP en las capas de la pared de la antera, el tapete y cmmi´s también fueron observadas en las flores femeninas de *Opuntia stenopetala* (Flores, 2005), *Consolea spinossisima*, *C. millspaughii*, *C. moniliformis*, *C. nashii* *C. picardeae*, *C. rubescens* (Strittmatter, *et al.* 2006) y *Opuntia robusta* (Alfaro, 2008).

De acuerdo a esto, la MCP está implicada en el desarrollo de los granos de polen en las flores masculinas de las especies estudiadas y está involucrada en el aborto del androceo de las flores femeninas, aun si hay diferencias en cuanto a la etapa del desarrollo en la cual ese evento sucede. Así, el adelanto en el patrón de MCP en las capas de la antera es el proceso que conduce a la esterilidad masculina en las especies unisexuales de Cactaceae.

### **Esterilidad femenina**

Las flores masculinas de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* producen numerosos granos de polen y tienen el gineceo normalmente desarrollado, ya que presentan estigma, estilo y numerosos óvulos maduros, por lo que de acuerdo con Sánchez (2010) estas especies presentan un sistema de reproducción ginodioico. Con las observaciones en el campo y después de realizar polinizaciones manuales, en el presente estudio se determinó que estas flores no producen fruto, por lo que no cumplen con la función femenina. Lo anterior llevó a determinar finalmente que su sistema de reproducción es funcionalmente dioico. Esto concuerda con lo encontrado por Hoffman, (1992) para poblaciones de *E. coccineus* en el suroeste de Estados Unidos, en las que reporta la presencia de restos de flores de años anteriores aparentemente sin fecundar únicamente en los tallos de plantas masculinas y que en las plantas femeninas el perianto se mantiene en los frutos.

Generalmente en las especies de angiospermas con estilos huecos, los tubos polínicos crecen a través de las células del canal estilar (células de la epidermis interna del estilo) o bien sobre el propio canal estilar lleno de secreción nutritiva para que los tubos polínicos puedan crecer y alcanzar los óvulos (Raghavan, 1997).

Tanto en *E. coccineus* y *E. polyacanthus* el canal estilar en ambos morfos florales está formado por células papiladas de la epidermis interna de los carpelos que se fusionan. Estas células contienen taninos, el canal carece de secreción, por lo que en este caso no consideramos que estas especies presenten estilos huecos típicos (funcionales), ya que el tejido de transmisión está formado por células más internas a la epidermis del canal. Asimismo se detectaron tubos polínicos creciendo en el tejido de transmisión, lo cual sugiere que las células del canal estilar no forman parte del tejido de transmisión en estas especies, porque no es la zona por la cual crecen los tubos polínicos. Esto mismo fue

observado por Hernández (2008) en *O. robusta* y en *Consolea spinossisima* por Strittmatter *et al.* (2002) y quienes denominan a este tipo de estilo como semisólido.

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 los parásitos, asimismo favorecen el retraso en la descomposición del tejido vegetal. Probablemente las células papiladas de la epidermis interna del canal estilar forman una barrera de protección contra los parásitos o herbívoros para 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.

Las flores masculinas de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* difieren de algunas otras flores masculinas reportadas para la familia por tener el gineceo bien desarrollado, es decir estigmas y estilos funcionales y en el ovario gran cantidad de óvulos. Por ejemplo en las flores masculinas de *O. robusta*, *O. stenopetala*, *Echinocereus yavapaiensis*, *Consolea spinossisima*, *Pereskia portulacifolia* y *Pachycereus pringlei*, el gineceo está reducido, carece de estigma (en el caso de *O. stenopetala*) o éste es reducido (como en *O. robusta* y *P. portulacifolia*) y generalmente no presentan óvulos o no alcanzan un desarrollo completo (Leuenberger, 1986; Fleming *et al.*, 1994; Orozco, 2002; Strittmatter *et al.*, 2002; Baker, 2006; Silva, 2007; Camacho, 2009). Al igual que en las flores masculinas de *E. coccineus* y *E. polyacanthus*, los lóbulos estigmáticos de *C. spinossisima* permanecen cerrados (Strittmatter, *et al.* 2002).

En la presente investigación, las flores masculinas de *E. coccineus* analizadas, presentaron tubos polínicos creciendo a través del estilo hasta el ovario, incluso se observó la presencia del cigoto en algunos óvulos, los cuales no presentaron evidencias de MCP. Sin embargo no se formaron frutos, por lo que se desconoce la etapa en la que el desarrollo de éstos se detiene. Proponemos dos posibles explicaciones al respecto, primeramente que dado que hay óvulos formados normalmente y tanto el estigma como el estilo son funcionales, la abortición ocurra después de la fecundación, ya que no se observó el desarrollo de frutos en ninguna de las flores polinizadas ni en aquellas observadas en campo. La segunda explicación es que no puede descartarse que la población sea subdioica,

es decir que además de los individuos femeninos y masculinos se presenten algunos individuos hermafroditas en menor proporción, y que hayan sido los que se observaron.

En las flores masculinas de *E. polyacanthus* a diferencia de *E. coccineus*, no se observaron tubos polínicos en la base del estilo ni en el ovario, el crecimiento de los tubos polínicos a través del estilo que pone en evidencia la funcionalidad del estigma y estilo también fue detectado en las flores masculinas polinizadas de *O. robusta*, *Consolea spinosissima* y *Mussaenda pubescens*, donde tampoco se forman frutos (Strittmatter, *et al.*, 2002; Hernández, 2008; Li, *et al.*, 2010).

En ambas especies se observaron menor cantidad de tubos polínicos creciendo en los estilos de las flores masculinas, esto debido a que el tejido de transmisión en estas flores se encuentra reducido. Asimismo, la interrupción del crecimiento de los tubos polínicos en *E. polyacanthus* puede deberse a un sistema de autoincompatibilidad, mecanismo que pudo haber sido desarrollado para evitar la autopolinización (Li, *et al.* 2010).

La presencia del gineceo bien desarrollado y parcialmente funcional en las flores masculinas, así como la posible presencia de individuos hermafroditas en las poblaciones puede indicar que estas especies se encuentran en una etapa evolutiva temprana desde el hermafroditismo hacia el dioicismo, en la que aún no se ha eliminado del todo la función femenina. Esto sugiere que la ruta de evolución que siguen estas especies es a través del ginodioicismo, lo cual implica la acumulación sucesiva de varias mutaciones, que causen en algunos individuos esterilidad masculina y en otros esterilidad femenina. Posiblemente algunas mutaciones generen individuos femeninos, resultando en poblaciones ginodioicas. Otras mutaciones pueden inducir esterilidad femenina en los individuos hermafroditas, generando individuos masculinos y el resultando en una población dioica. El tiempo entre una mutación y otra puede variar, generando poblaciones trioicas y subdioicas (Charlesworth & Charlesworth, 1978).

En las flores femeninas de *E. polyacanthus* se observaron tricomas en los funículos de los óvulos, aunque menos abundantes y de menor longitud respecto a los observados en los funículos de las flores masculinas, Almeida *et al.* (2010) mencionan que en los funículos de algunas especies de cactáceas bisexuales, los tricomas sirven de obturadores durante la fecundación, por lo cual consideramos que la diferencia encontrada entre el obturador de las flores masculinas y femeninas de las especies estudiadas puede influir en

la funcionalidad de este tejido y que sea otro impedimento más para que los tubos polínicos lleguen a tiempo a alcanzar y fecundar a los óvulos, aunque éstos estén bien desarrollados .

Para ambos morfos florales de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* se observaron evidencias de MCP en algunas células del tejido de transmisión del estilo en etapas cercanas a la antesis, lo que de acuerdo con Wu y Cheung (2000) sucede generalmente en el tejido de transmisión (TT) antes de la polinización, ya que se requiere que las células del TT degeneren y liberan materiales celulares para ayudar al proceso de polinización en la superficie estigmática y al crecimiento del tubo polínico a través del estilo.

Asimismo se encontraron evidencias de MCP en el ovario y óvulos de las flores masculinas, atribuyéndose a este evento la causa principal de que no se desarrollen los frutos, esto concuerda con lo observado en flores masculinas de *Opuntia stenopetala* y *Opuntia robusta*, donde la MCP actúa como un mecanismo que lleva a la atrofia del verticilo sexual femenino en estas especies con flores unisexuales (Vázquez-Santana *et al.*, 2007; Hernández, 2008).

A pesar de que en ambas especies estudiadas las flores masculinas presentan el gineceo bien desarrollado, la esterilidad femenina se manifiesta en la falta de producción de semillas y frutos. Para *E. coccineus* no se observaron evidencias suficientes que determinen los mecanismos que conducen a la esterilidad femenina, sin embargo proponemos que sea una barrera postcigótica puesto que la abortión ocurre después de la formación del cigoto. Para *E. polyacanthus* la abortión es precigótica ya que los tubos polínicos no llegan al ovario. Se encontró que la reducción en el tejido de transmisión y en el tamaño de los tricomas en los funículos de los óvulos y las evidencias de MCP en ovario y óvulos son los mecanismos que conducen a la esterilidad femenina en esta especie.

### **Análisis cuantitativo**

De acuerdo con Aisworth (2000), uno de los modelos de evolución de las poblaciones dioicas es el modelo de asignación de recursos: En las plantas hermafroditas, la producción de polen y de óvulos puede limitarse mutuamente, por lo que la separación espacial de los sexos ocasiona una eficiente distribución de los recursos, así los individuos unisexuales asignarán más recursos a las funciones masculinas o femeninas que los hermafroditas.



Para *E. coccineus* el análisis cuantitativo de caracteres reveló que existen diferencias en cuanto a la asignación de recursos entre las flores masculinas y femeninas, al observar anteras y estambres más largos en las flores masculinas y mayor número de lóbulos estigmáticos y óvulos en las flores femeninas. Respecto a los caracteres cuantitativos, para *E. polyacanthus*, la longitud de los estambres y el largo de las anteras de las flores masculinas es significativamente mayor que el observado en las flores femeninas. En los caracteres del gineceo no se observaron diferencias, lo que indica que en esta especie el tamaño de las estructuras del gineceo no está correlacionado con la funcionalidad.

Las diferencias morfológicas del androceo y gineceo (para *E. coccineus*) entre los morfos, manifiestan una mayor eficiencia en la distribución de recursos en la función masculina y femenina.

Los estilos de las flores masculinas de ambas especies son más largos en relación con los de las flores femeninas. Esto coincide con lo encontrado por Hoffman (1992) en poblaciones dioicas de *E. coccineus* de Nuevo México. Una interpretación a este hecho puede ser que posiblemente el ancestro hermafrodita, antes de perder la función femenina desarrolló estilos más largos para evitar la autopolinización.

### **Consideraciones finales**

Se ha corroborado que en casi todas las especies dioicas que se han descrito para la familia Cactaceae, el desarrollo floral inicia como bisexual, pero en etapas posteriores uno de los verticilos sexuales se atrofia y detiene su crecimiento, es decir que se atrofia el androceo en las flores femeninas y el gineceo en las flores 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; Hernández, 2008; Silva, 2007), *Pereskia portulacifolia* (Leuenberger, 1986; Camacho, 2009), *P. marcanoi* (Areces-Mallea, 1992), *Echinocereus coccineus* (Hoffman, 1992), *Pachycereus pringlei* (Fleming *et al.*, 1994), *O. sanfelipensis* (Rebman, 1998), *Consolea rubescens* (Strittmatter y Negrón-Ortiz, 2000), *O. quitensis* (Anderson, 2001), *O. stenopetala* (Orozco, 2002; Flores, 2005; Alfaro, 2008), *C. spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002), *O. quimilo* (Díaz y Cocucci 2003), *C. corallicola* (Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004), *E. yavapaiensis* (Baker 2006),

*C. millspaughii*, *C. moniliformis*, *C. nashii* y *C. picardeae* ( Strittmatter, *et al*, 2006) y *Mamillaria dioica* (Sánchez, 2007).

En la familia Cactaceae, las especies que han sido reportadas con un sistema reproductivo diferente del hermafrodita generalmente 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 antesis. 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 la atrofia de uno de los verticilos sexuales.

De acuerdo a Orozco (2002) la unisexualidad en los miembros de la familia Cactaceae posiblemente ha surgido evolutivamente en múltiples ocasiones, teniendo diversos orígenes. Esto puede ser lo que ocurre en las especies estudiadas en la presente investigación, las cuales a pesar de estar filogenéticamente relacionadas presentan patrones de aborción de las estructuras sexuales a diferentes tiempos, así como una morfología diferente.

## CONCLUSIONES

En la familia Cactaceae, las flores unisexuales generalmente empiezan su desarrollo como flores bisexuales, deteniendo el crecimiento de uno de los verticilos sexuales en diferentes etapas, conservando estructuras remanentes del sexo opuesto, lo que podría indicar que han evolucionado o están evolucionando de un ancestro hermafrodita hacia el dioicismo funcional.

*Echinocereus coccineus* presenta dos morfos florales, flores funcionalmente femeninas con androceo reducido cuyas anteras empiezan a degenerar en etapa de célula madre de la microspora, debido a un proceso de muerte celular programada en el tapete y otras capas de la antera. El gineceo es funcional y se forma fruto. Las flores funcionalmente masculinas tienen androceo bien desarrollado y producen numerosos granos de polen, poseen estigmas y estilos funcionales, numerosos óvulos pero no se forma el fruto.

*E. polyacanthus* presenta dos morfos florales, flores funcionalmente femeninas que presentan androceo reducido, las anteras empiezan a degenerar en etapa de célula madre de la microspora, debido a un proceso de muerte celular programada en el tapete, y otras capas de la antera. El gineceo está bien desarrollado y es funcional por lo que se forma el fruto. Las flores funcionalmente masculinas poseen un androceo bien desarrollado y producen numerosos granos de polen, estigma funcional y estilo parcialmente funcional, poseen numerosos óvulos pero no se forma fruto, lo cual puede deberse a la funcionalidad parcial del estilo, a la reducción de tricomas en los funículos y a un proceso de muerte celular programada.

De acuerdo con los resultados de este estudio, se determinó que el sistema reproductor tanto de *E. coccineus* y *E. polyacanthus* es funcionalmente dioico, ya que si bien ambas flores mantienen las estructuras del sexo opuesto, éstas no son funcionales.

## **PERSPECTIVAS**

Este trabajo revela el verdadero sistema reproductor de las poblaciones estudiadas de *Echinocereus coccineus* y *E. polyacanthus*, así como los mecanismos involucrados en el desarrollo de la unisexualidad.

Sin embargo, ¿existirán otras poblaciones de estas especies, con sistemas reproductores diferentes?, ¿Cuál es la etapa y el patrón de aborción del fruto en los individuos masculinos que desarrollan cigotos? ¿Son estos individuos en realidad masculinos? o ¿hermafroditas con esterilidad femenina parcial como los encontrados en poblaciones subdioicas de otras especies?

Para resolver estas preguntas es necesario contar con una muestra más representativa de individuos, incluir más poblaciones, realizar un mayor número de polinizaciones controladas y seguir el desarrollo de los frutos y semillas.

## LITERATURA CITADA

- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. *Annals of Botany* **86**: 211-221.
- Alfaro, I. 2008. Estudio de la muerte celular programada durante el desarrollo de las anteras en flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* Engelmann y *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias UNAM. México D.F. 61pp.
- Almeida, J. Sartori-Paoli, A. y de Souza, L. 2010. Flower morpho-anatomy in *Epiphyllum phyllanthus* (Cactaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* **81**: 65- 80.
- Anderson, E. F. 2001. The cactus family. Timber Press. E. U. A. 776 pp.
- Areces-Mallea, A. E. 1992. *Pereskia marcanoi* a new species of Cactaceae from Hispaniola. *Brittonia* **44**: 423-428.
- Balk, J. y J. Leaver. 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *The Plant Cell* **13**: 1803-1818.
- 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.
- Bawa, K. 1980. Evolution of Dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**:15-39.
- 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.
- Camacho, A. 2009. Desarrollo de las flores masculinas de la especie dioica *Pereskia portulacifolia* (L.) DC. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias UNAM. México D.F. 48pp.
- 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* ssp. *silvestris*. *Sex Plant Reproduction* **15**:291–300.
- Charlesworth, B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* **112**: 975-997.
- Coimbra, S., L. Torrão y I. Abreu. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**:537–541.
- Del Castillo, R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Estado de México. 133 pp.
- 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.
- 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.

- Gómez, S. 2010. Embriología de la especie androdioica *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeberg (Cactaceae) Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias UNAM. México D.F. 49pp.
- 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.
- Hernández, R. 2008. Estudio de la muerte celular programada en el gineceo de las flores masculinas de *Opuntia robusta* J.C. Wendl. (Cactaceae) Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias UNAM. México D.F. 72pp.
- Hunt, 2006. The New Cactus Lexicon. David Hunt. England. 373pp.
- Hoffman, T. M. 1992. Functional Dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): Breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany* **12**: 1382-1388.
- Kimnach, M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus and Succulent Journal* **54**: 3-7.
- Lebel-Hardenack, S. y S. Grant. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science* **2**: 130-136.
- Leuenberger B.E. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). Memoirs of the New York Botanical Garden. **41**: 1-133.
- Li, N. Zhang, D. Liu, H. Yin, Ch. Li, X. Liang, W. Yuan, Z. Xu, B. Chu, H. Wang, J. Wen, T. Huang, H. Luo, D. Ma, H. y D. Zhang. 2006. The Rice Tapetum Degeneration Retardation Gene Is Required for Tapetum Degradation and Anther Development. *Plant Cell* **18**: 2999-3014.
- Li, A. X, Wu. D, Zhang y S. Barret. 2010. Cryptic dioecy in *Mussaenda pubescens* (Rubiaceae): a species with stigma-height dimorphism. *Annals of Botany* **106**: 521–531.
- Lindsay G. y E. Dawson. 1952. *Mammillaria* of the islands off Northwestern Baja California, México. *Cactus and Succulent Journal* **24**: 76-84.
- 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. Netherlands. 392 pp.
- Nuñez, C. 2004. Cactáceas columnares de México: estudio embriológico de cinco especies de la tribu *Pachycereeae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 178pp.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala*. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 82 pp.
- Papini, A. S. Mosti y L. Brighigna. 1999. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma* **207**:213-221.
- 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. 712pp.
- Rebman, J. 1998. A new cholla (Cactaceae) from Baja California , Mexico. *Haseltonia* **6**: 17-21.
- Roche. 2002. In situ cell death Detection Kit, AP. Instruction Manual. Alemania. 23 pp.
- Sánchez, D. 2007. Embriología de *Mammillaria dioica* K. Brandegees (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 52 pp.

- Sánchez, D. 2010. Sistemática filogenética de *Echinocereus* sección *Triglochidiati* (Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática). Instituto de Biología. UNAM. México, D.F. 113pp.
- Shykoff, J., E. Bucheli, O. Kaltz. 1996. Flower lifespan and disease risk. *Nature* **379**: 779–780.
- Silva, J. A. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 61 pp.
- 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.
- Varnier, A. F. Mazeyrat-Gourbeyre, R. Sangwan y C. Clément. 2005. Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *Journal of Structural Biology* **152**:118–128.- 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.
- Wu, H., y Y. Cheung. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* **44**: 267-281.
- Wyatt, R. 1983. Breeding systems. En *Pollination Biology* (ed. L.Real). Academic Press. E.U.A.
- Zucker, W. 1983. Tannins: Does Structure Determine Function? An Ecological Perspective. *The American Naturalist* **121**( 3): 335-365